

***Rab-Proteine kontrollieren die Chlamydien-induzierte  
Fragmentierung des Golgi-Apparates***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Anette Rejman Lipinski  
(geb. 10.10.1977 in Pyskowice/Polen)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:   1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert  
                          2. Prof. Dr. Thomas F. Meyer  
                          3. PD Dr. Antje Flieger

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2009



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG (deutsch) .....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY (englisch).....</b>	<b>4</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1 Chlamydien.....	5
1.1.1 Taxonomie der Chlamydien .....	5
1.1.2 Klassifikation und klinische Bedeutung von Chlamydien-Infektionen .....	6
1.1.3 Der Entwicklungszyklus von Chlamydien .....	7
1.2 Grundzüge des intrazellulären Transportes in eukaryontischen Zellen .....	10
1.2.1 Der Golgi-Apparat .....	10
1.2.2 Die Golgi-Matrix .....	11
1.2.3 Beförderung von Vesikeln innerhalb des sekretorischen Transportweges .....	12
1.2.3.1 Formation von Vesikeln .....	13
1.2.3.2 Rab-Protein-vermittelter Vesikeltransport.....	15
1.2.3.3 Verankerung und Fusion von Vesikeln an der Zielmembran.....	18
1.2.4 Transport von Lipiden in eukaryontischen Zellen .....	18
1.3 Chlamydiale Interaktionen mit den Transportwegen der Wirtszelle .....	19
1.4 siRNA-Technologie .....	21
1.5 Fragestellung .....	22
<b>II. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien .....	23
2.2 Geräte .....	23
2.3 Verwendete Datenbanken und Programme .....	23
2.4 Zellkultur.....	24
2.5 Infektionen von Zellen mit <i>C. trachomatis</i> .....	24
2.6 Herstellung von <i>C. trachomatis</i> -Stammlösungen .....	25
2.7 Bestimmung des <i>C. trachomatis</i> -Titers .....	26
2.8 Quantifizierung der primären Infektion .....	28
2.9 Bestimmung der Infektivität von Chlamydien .....	30
2.10 Bestimmung der Zellzahl mittels des LDH Tests .....	32
2.11 Transfektion von siRNA .....	32
2.12 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) .....	35

---

2.13	Herstellung stabil transduzierter Zelllinien .....	36
2.14	Bestimmung der Zellvitalität mittels des WST-1-Proliferationstest .....	38
2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration und Immunodetektion .....	39
2.16	Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie .....	41
2.17	Lebendzellmikroskopie.....	43
2.18	Transmissionselektronenmikroskopie .....	44
2.19	Statistische Datenanalyse.....	45
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
3.1	Struktur des Golgi-Apparates während der Infektion mit <i>C. trachomatis</i> .....	46
3.2	Einfluss von Golgi-Proteinen auf die Vermehrung von Chlamydien.....	47
3.2.1	Validierung des siRNA-vermittelten Verlustes von Golginen .....	47
3.2.2	Untersuchung zytotoxischer Effekte nach siRNA-Behandlung gegen Golgi-Proteine .....	49
3.2.3	Struktur des Golgi-Apparates in siRNA-behandelten Zellen .....	50
3.2.4	Auswirkungen der Golgi-Fragmentierung auf die chlamydiale Entwicklung.....	51
3.3	Die Rolle von Rab-Proteinen in der Chlamydien-Infektion .....	52
3.3.1	Validierung des Verlustes von Rab-Proteinen mittels RNAi .....	52
3.3.2	Untersuchung zytotoxischer Effekte nach siRNA-Behandlung gegen Rab-Proteine.....	54
3.3.3	Auswirkungen des <i>knock down</i> von Rab-Proteinen auf die primäre Infektion und die bakterielle Infektivität.....	54
3.3.4	Herunterregulation von Rab-Proteinen mittels RNAi in anderen Zelllinien .....	56
3.3.5	Herstellung stabiler Rab6- und Rab11 <i>knock down</i> Zellen .....	57
3.3.6	Untersuchung der Primärinfektion in shRNA-vermittelten <i>knock down</i> Zellen .	59
3.3.7	Ultrastrukturelle Analyse von <i>C. trachomatis</i> -infizierten <i>knock down</i> Zellen ....	60
3.3.8	Morphologische Erscheinung des Golgi-Apparates in nicht-infizierten und <i>C. trachomatis</i> -infizierten Rab6- und Rab11 <i>knock down</i> Zellen .....	62
3.3.9	Spaltung von Golgin-84 in stabilen <i>knock down</i> Zellen.....	65
3.4	Untersuchung zum Transport von Sphingolipiden in die Inklusion unter Verlust von Rab6 und Rab11 .....	66
3.5	Untersuchungen zum simultanen Verlust von Rab-Proteinen und Golginen.....	69
3.5.1	Analyse der Golgi-Struktur nach simultaner Herunterregulation von Rab- Proteinen und Golginen .....	69
3.5.2	Untersuchung der Golgi-Struktur nach simultaner Herunterregulation von Rab-Proteinen und Golginen in Chlamydien-infizierten Zellen .....	71

---

3.5.3 Vergleich der Infektivitäten in Golgin-84- und p115-siRNA-behandelten stabilen Rab6- und Rab11- <i>knock down</i> Zellen .....	74
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
4.1 Bedeutung der Golgi-Fragmentierung für Chlamydien-Infektionen.....	78
4.1.1 <i>C. trachomatis</i> -Infektion führt zur Auflösung der Struktur des Golgi-Apparates.....	78
4.1.2 RNAi-induzierte Golgi-Fragmentierung fördert die chlamydiale Vermehrung...	79
4.2 Rab-Proteine sind wichtig für die chlamydiale Entwicklung.....	80
4.2.1 Chlamydien können in Rab6- und Rab11-vermittelte Transportwege eingreifen .....	82
4.2.2 Rab6- und Rab11-dekorierte Vesikel werden über spezifische Inc-Proteine an der Inklusionsmembran gebunden .....	84
4.2.3 Bedeutung von Rab-Proteinen für andere Pathogene .....	85
4.3 Funktioneller Ausfall von Rab6 und Rab11 verhindert die Golgin-84-abhängige Fragmentierung des Golgi-Apparates .....	86
4.4 Rab-Proteine sind entscheidend für den Transport von Sphingolipiden in die Inklusion .....	88
4.5 Modell zur Regulation der Chlamydien-induzierten Golgi-Fragmentierung durch Rab-Proteine.....	91
4.6 Ausblick.....	93
<b>V. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>VI. DANKSAGUNG.....</b>	<b>108</b>
PUBLIKATIONSLISTE .....	109
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....	110

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	aberrante Körperchen
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CERT	<i>ceramide transfer protein</i>
COP	<i>coat-protein complex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EK	Elementarkörperchen
EE	<i>early endosome</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hsp	Hitzeschockprotein
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFU	<i>inclusion forming units</i>
KCl	Kaliumchlorid
KD	<i>knock down</i>
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LE	<i>late endosome</i>
Min.	Minuten
Mio.	Millionen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MeOH	Methanol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
ml	Milliliter

µl	Mikroliter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
nM	Nanomol
NP-40	4-Nonylphenyl-Polyethylen Glycol
OAS	Oligoadenylat-Synthetase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PKR	RNA-abhängige Proteinkinase R
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p.t.</i>	<i>post transfectionem</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RE	Recycling-Endosomen
RK	Retikularkörperchen
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Tab.	Tabelle
Tarp	<i>Translocated actin recruiting phosphoprotein</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

## ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit kommt es jährlich zu 90 Mio. Neuinfektionen mit *Chlamydia trachomatis*. Infektionen mit diesen sexuell übertragbaren Erregern sind bei Frauen der häufigste Grund für Unfruchtbarkeit. Allerdings sind die Faktoren, die eine erfolgreiche bakterielle Vermehrung ermöglichen, weitgehend unbekannt.

Während ihrer obligat intrazellulären Entwicklung sind Chlamydien auf die Errichtung und Erhaltung ihrer Nische, der Inklusion, angewiesen. Ihr Überleben in der Zelle sichern die Bakterien unter anderem durch Interaktionen mit vesikulären Transportwegen der Wirtszelle, wie z.B. der Fusion mit Vesikeln, die Sphingolipide aus dem Golgi-Apparat transportieren. Der genaue Mechanismus der Lipidaufnahme ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chlamydien während einer Infektion die Auflösung der Struktur des Golgi-Apparates induzieren. Allerdings ist über die Kontrolle und die Bedeutung der Golgi-Fragmentierung auf die Pathogenese des Bakteriums wenig bekannt. Mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik (RNAi) wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des Verlustes von Golgi-Strukturproteinen auf die bakterielle Vermehrung untersucht. Der funktionelle Ausfall von Golgin-84, Giantin, p115 und Gpp130 führte zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates. Diese begünstigte die chlamydiale Entwicklung gemessen an einer mehr als fünffachen Steigerung der Produktion neuer infektiöser Partikel, was eine verbesserte Versorgung mit Nährstoffen nahelegt. In vesikulären Transportmechanismen von Nährstoffen übernehmen Rab-Proteine eine Schlüsselrolle. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust verschiedener Rab-Proteine durch RNAi den Entwicklungszyklus der Chlamydien spezifisch beeinflusste. Der Verlust von Rab6 und Rab11 führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl infektiöser Nachkommen. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass der Entwicklungszyklus nicht abgeschlossen werden konnte, was die Produktion infektiöser Partikel stark herabsetzte. Des Weiteren wurde in Rab6- und Rab11-herunterregulierten Zellen der Golgi-Apparat nicht fragmentiert und der Transport von Sphingolipiden zu den Bakterien stark vermindert. Untersuchungen nach simultaner Herunterregulation von Golgin-84 und Rab6 oder Rab11 demonstrierten abschließend, dass eine Kontrolle der Golgin-84-induzierten Golgi-Fragmentierung über Rab-Proteine möglich sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit offenbaren einen neuen Zusammenhang zwischen der Struktur des Golgi-Apparates und dessen Kontrolle über Rab-Proteine und ermöglichen einen tieferen Einblick in die Funktion des Golgi-Apparates während einer Chlamydien-Infektion. Die Regulation der Golgi-Struktur durch Rab-Proteine bietet als möglicher anti-chlamydialer Mechanismus neue Ansätze zur Therapie von Chlamydien-Infektionen.



## SUMMARY

Worldwide, approximately 90 mio. people are infected with the obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis*. This important human pathogen is thought to be the leading cause of infertility and ectopic pregnancy in women; however the factors involved in its successful infection and replication remain unknown.

For successful development, the Chlamydia are dependent on the establishment and maintenance of a special niche, termed the inclusion. To ensure survival, the chlamydial inclusion exhibits a number of vesicular interactions, such as fusion with exocytic Golgi-derived vesicles that transport sphingolipids to the plasma membrane. However, the exact mechanisms by which Chlamydia acquire these lipids have not been elucidated.

The present work established that infection of host mammalian cells with *C. trachomatis* induced fragmentation of the Golgi-apparatus, but details of the mechanisms underlying its control and the relevance of Golgi fragmentation to the bacterium's pathogenesis are still required. Using RNA-Interference (RNAi) mediated loss-of-function studies the role of specific Golgi-apparatus structural proteins in bacterial infectivity was investigated. Knock down of Golgin-84, giantin, p115 and Gpp130 in host cells resulted in a fragmented Golgi-apparatus and an associated increase in chlamydial replication. Infectivity in knock down cells was increased by five times compared to control cells, suggesting an enhanced acquisition of nutrients. Since Rab-proteins are known to co-ordinate the intracellular vesicular transport of nutrients, their importance in chlamydial infectivity was also investigated. Interestingly, knock down of Rab-proteins influenced bacterial growth. Depletion of Rab6 and Rab11 led to a significant reduction in infectious progeny. Electron microscopy analysis revealed that the chlamydial developmental cycle was not fully completed, resulting in a decreased amount of infectious particles. Surprisingly, upon knock down of Rab6 or Rab11 the Golgi-apparatus remained intact. In addition, sphingolipid transport into the inclusion was severely perturbed. Finally, analysis of cells simultaneously depleted of golgin-84 and Rab6 or Rab11 suggested a possible role of Rab-proteins in the control of golgin-84-induced Golgi fragmentation.

These data demonstrate a yet unknown relationship between the structure of the golgi-apparatus and its regulation and control by Rab-proteins. Furthermore, this work contributes to the existing knowledge regarding the function of the Golgi-apparatus during chlamydial infections. The regulation of the Golgi structure as a possible anti-chlamydial mechanism offers new strategies for the treatment of chlamydia-infections.

## I. EINLEITUNG

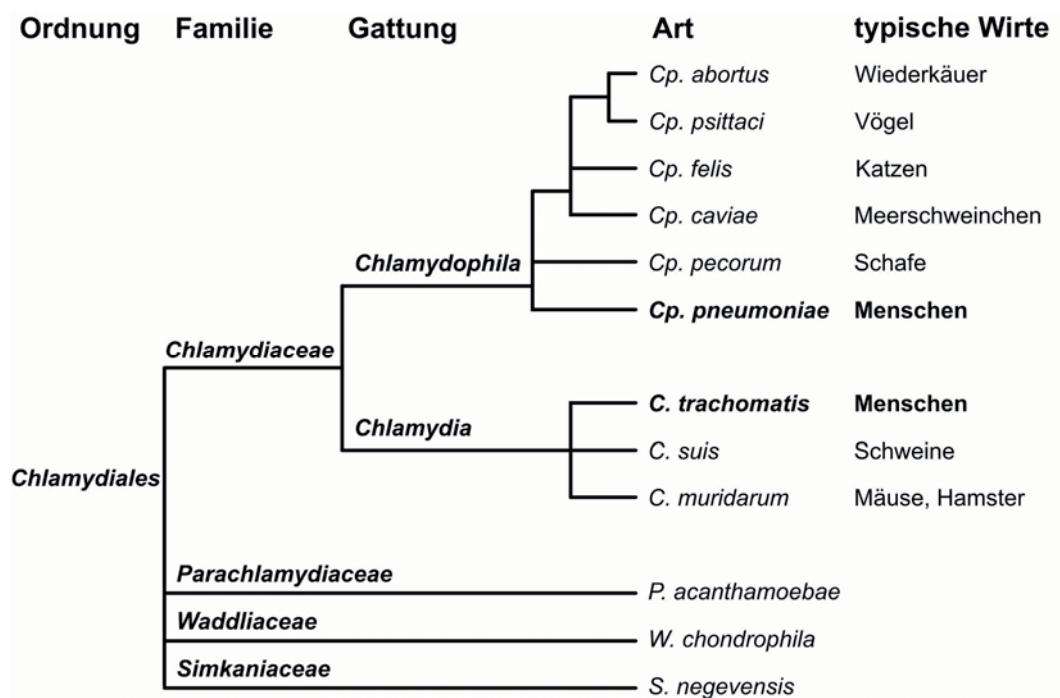
### 1.1 Chlamydien

Die ersten Indizien für Chlamydien-Infektionen lieferten bereits 1500 vor Christus ägyptische Beschreibungen von Augenkrankheiten, insbesondere des Trachoms, im Papyrus Ebers. 1907 konnten Stanislaus von Prowazek und Ludwig Halberstaedter charakteristische Einschlusskörperchen in Trachomen nachweisen, die sie als *Chlamydozoa* („klamys“, griech. Mantel) bezeichneten (Halberstaedter und Von Prowazek, 1907). Heute weiss man, dass es sich bei dem verursachenden Erreger um ein Bakterium handelt; es trägt den Namen *Chlamydia trachomatis*.

Chlamydien sind weltweit verbreitet und können eine Reihe unterschiedlichster Krankheiten hervorrufen. Sie verursachen Infektionen des Auges, der Lunge und des Genitaltraktes und werden auch mit chronischen Erkrankungen, wie z.B. koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose oder Asthma in Verbindung gebracht. Die Aufklärung ihrer pathogenen Eigenschaften ist daher von großem Interesse für die biologisch-medizinische Wissenschaft.

#### 1.1.1 Taxonomie der Chlamydien

Chlamydien sind gram-negative Bakterien, die der Ordnung *Chlamydiales* angehören. Die phylogenetische Analyse von Chlamydien, insbesondere der 16S und 23S rRNA führten zu einer überarbeiteten Taxonomie (Everett *et al.*, 1999; Bush und Everett, 2001). Die Ordnung *Chlamydiales* besteht nun aus den vier Familien *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae*, und *Simkaniaceae* (Abb. 1.1). Die bekannten human- und tierpathogenen Chlamydien gehören zur Familie der *Chlamydiaceae*, in der die bisher einzige Gattung *Chlamydia* in die zwei Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydia* unterteilt wurde (Everett *et al.*, 1999; Bush und Everett, 2001). Im Gegensatz zu den *Chlamydiaceae* leben die Vertreter der *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* als Symbionten in Amöben (Amann *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 2000; Fritsche *et al.*, 2000).



**Abb. 1.1 Neue Taxonomie der *Chlamydiales* (nach Busch und Everett, 2001)**

Die Länge der Linien entspricht nicht der tatsächlichen phylogenetischen Distanz.

### 1.1.2 Klassifikation und klinische Bedeutung von Chlamydien-Infektionen

Die humanpathogenen Chlamydienspezies *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Chlamydophila pneumoniae* (*Cp. pneumoniae*) und *Chlamydophila psittaci* (*Cp. psittaci*) verursachen verschiedene Infektionskrankheiten beim Menschen.

Bei *C. trachomatis* werden drei Gruppen von Serovarianten unterschieden, die unterschiedliche Erkrankungen auslösen. Die Serotypen der ersten Gruppe, *C. trachomatis* A -C, verursachen das Trachom, eine Entzündung der Bindehaut und der Hornhaut, die vor allem in Entwicklungsländern endemisch auftritt und die häufigste vermeidbare Erblindungsursache in diesen Regionen darstellt (Gambhir *et al.*, 2007). In einigen Gegenden liegt die Infektionsrate der Bevölkerung bei über 90%.

Infektionen mit den Serovaren der zweiten Gruppe, *C. trachomatis* D-K, verursachen sexuell übertragbare Krankheiten (STD). Sie zählen mit weltweit über 90 Mio. Neuinfektionen pro Jahr zu den häufigsten Geschlechtskrankheiten (WHO, 2001). *C. trachomatis* D-K infizieren den urogenitalen Trakt. Viele dieser Infektionen verlaufen asymptomatisch, die Folgen

unerkannter Infektionen sind aber vor allem bei Frauen gravierend. Unbehandelte *C. trachomatis*-Infektionen können zu ektopischer Eileiterschwangerschaft, Tubenverschlüssen oder sogar Infertilität führen (Faro, 1985).

Das *Lymphogranuloma venereum* hingegen ist eine Folge der Infektion lymphatischen Gewebes der Genitorektalregion mit der dritten Gruppe von Serovarianten, *C. trachomatis* L1-L3. Diese sexuell übertragbare Krankheit ist vor allem in Entwicklungsländern endemisch und führt zu schmerzhaften Schwellungen der Lymphgefäße. Durch Vernarbung der Lymphknoten und des umliegenden Gewebes kann es zum Rückstau der Lymphe und Einengung des Enddarms kommen (Schachter und Osoba, 1983).

Die zur Gattung *Chlamydophila* gehörenden *Cp. pneumoniae* infizieren vornehmlich das Epithel des Respirationstraktes (Wreghitt, 1993). In Deutschland ist über die Verbreitung von *Cp. pneumoniae*-Infektionen wenig bekannt. Die Durchseuchungsrate wird auf etwa 60% der 20-Jährigen geschätzt, wobei der Großteil der Infektionen asymptomatisch verläuft (Robert Koch-Institut, 2001). Eine akute Infektion äußert sich in schweren Pneumonien und Bronchitis, die sich als chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) oder Asthma bronchiale manifestieren können. Des Weiteren wird eine Assoziation dieses Pathogenes mit der Entstehung von Arteriosklerose und der Alzheimer-Krankheit diskutiert (Saikku *et al.*, 1988; Grayston, 2000; Belland *et al.*, 2004).

Die bekannteste Chlamydiose bei Tieren, und unter allen Vogelarten verbreitet, ist die durch *Cp. psittaci* verursachte Psittakose (Papageien Krankheit) oder auch Ornithose (Infektion von Wild- und Nutzgeflügel) (Vanrompay *et al.*, 1995). Die Infektion verläuft mit grippeähnlichen Symptomen, die bis zum Tode des Tieres führen können.

Die Chlamydiosen bei Schafen, Rindern, Schweinen, hervorgerufen durch Infektionen mit *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* und *Cp. suis*, sind eine bedeutende Ursache für durch Aborte verursachte Tierverluste (Stamp *et al.*, 1952; Seaman, 1985; Wittenbrink *et al.*, 1991; Borel *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Der Entwicklungszyklus von Chlamydien

Die obligat intrazellulären Chlamydien vermehren sich in einem speziellen membranumhüllten Kompartiment, welches als Inklusion bezeichnet wird. Innerhalb dieser Inklusion durchlaufen alle Chlamydienspezies einen unter Bakterien einzigartigen

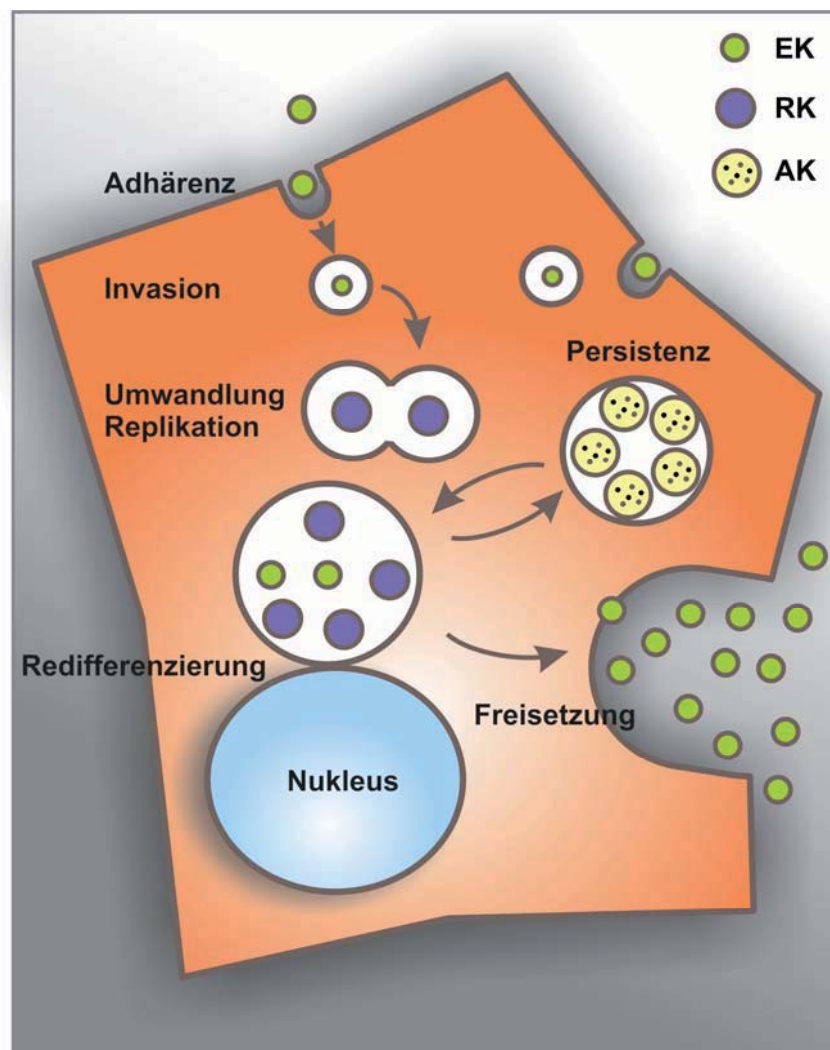
Entwicklungszyklus (Abb. 1.2). Charakteristisch hierbei ist das Auftreten zweier unterschiedlicher morphologischer Formen, den Elementarkörperchen (EK) und den Retikularkörperchen (RK). Die etwa 0,3  $\mu\text{m}$  großen EK repräsentieren die elektronendichte, infektiöse, aber metabolisch inaktive Form. Die metabolisch aktiven, aber nicht infektiösen Partikel (1-1,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser) bezeichnet man als RK (Moulder, 1991). Sie stellen die sich replizierende Form der Bakterien dar.

Der Infektionsprozess beginnt mit der Adhäsion des EK an die Wirtszelle. Spezifische Rezeptoren für die Aufnahme von EK konnten bisher nicht identifiziert werden. Die Beteiligung von Heparin und Heparansulfat und anderen Proteinen an der Adhäsion von EK werden diskutiert (Zhang und Stephens, 1992; Wehl *et al.*, 2004). Die endo- oder phagozytotische Aufnahme kann je nach Spezies über Clathrin-abhängige Wege, Caveolin-vermittelte Routen oder auch über Lipidmikrodomänen, *lipid rafts*, verlaufen (Stuart *et al.*, 2003; Hybiske und Stephens, 2007a). Darüber hinaus wurde ein chlamydiales Typ III Sekretionssystem beschrieben, das durch die Translokation von chlamydialen Effektorproteinen in die Wirtszelle die Aufnahme einleitet (Clifton *et al.*, 2004).

Einige Stunden nach Internalisierung redifferenzieren die EK in RK, was sich im Verlust der Infektivität, der DNA-Dekondensation, der Vergrößerung und dem Einsetzen der Replikation zeigt. Zudem kommt es zu aktiven Modifikationen der Inklusionsmembran, die notwendig sind, um diese bakterielle Nische vor der Fusion und dem Abbau in Lysosomen zu schützen und eine Versorgung mit von der Wirtszelle stammenden Substanzen, wie z.B. Eisen zu gewährleisten (Heinzen *et al.*, 1996; Ojcius *et al.*, 1997; van Ooij *et al.*, 1997; Al Younes *et al.*, 1999). Je nach Chlamydienspezies beginnt 20 h bis 48 h nach der Infektion die Umwandlung der RK zurück in infektiöse EK (Hodinka *et al.*, 1988; Wolf *et al.*, 2000). Die Entwicklung der einzelnen Chlamydien verläuft ab diesem Zeitpunkt asynchron. Am Ende des Zyklus werden die neu gebildeten infektiösen Bakterien in den extrazellulären Raum freigesetzt.

Zwei Mechanismen zur Freisetzung wurden von Hybiske und Stephens beschrieben (Hybiske und Stephens, 2007b; Hybiske und Stephens, 2008). Zum einen konnte eine Zelllyse des Wirtes nachgewiesen werden und zum anderen ein als Inklusionssekretion bezeichneter Mechanismus beobachtet werden. Dabei wird die gesamte unbeschädigte Inklusion aus der Wirtszelle in den extrazellulären Raum abgesondert. Die Wirtszelle verbleibt nach dem Abschnüren der Inklusion intakt. Einige Bakterien können allerdings in der Zelle zurückbleiben und somit einen neuen Mechanismus für eine persistente Infektion darstellen.

Ursachen einer persistenten Infektion können u.a. Nährstoffmangel, wie Eisenmangel oder Tryptophanverarmung, oder weitere limitierende Bedingungen, wie z.B. eine Behandlung mit Penicillin sein (Beatty *et al.*, 1994; Mehta *et al.*, 1998). Unter diesen Umständen kann der Entwicklungszyklus nicht vollständig durchlaufen werden, was zum Entstehen sogenannter aberranter Körperchen (AK) führt. Diese unterscheiden sich morphologisch von EK und RK insbesondere in ihrer gesteigerten Größe. AK sind zwar metabolisch aktiv, redifferenzieren allerdings nicht in EK und werden nicht aus der Wirtszelle freigesetzt. Auf diese Weise können Chlamydien ihren Wirt langfristig infizieren. Durch Zuführung von Eisen oder dem Wegfall limitierender Bedingungen „erwachen“ die Bakterien aus der Persistenz und können ihre Entwicklung wieder fortsetzen (Beatty *et al.*, 1993; Al Younes *et al.*, 2001).



**Abb. 1.2 Entwicklungszyklus von Chlamydien**

Siehe Text für Erklärung.

EK = Elementarkörperchen, RK = Retikularkörperchen, AK = aberrante Körperchen

Der chlamydiale Entwicklungszyklus lässt erkennen, dass eine erfolgreiche Entwicklung und Vermehrung der Bakterien von ihrer Fähigkeit abhängt, mit der Wirtszelle in Wechselwirkung zu treten. Bevor näher auf die chlamydialen Interaktionen mit der Wirtszelle eingegangen wird, sollen zunächst Grundzüge intrazellulärer Transportmechanismen erläutert werden.

## 1.2 Grundzüge des intrazellulären Transportes in eukaryontischen Zellen

Eukaryontische Zellen weisen eine komplexe Kompartimentierung auf. Die Zellphysiologie wird durch intrazellulären Transport von Proteinen und Membranen aufrechterhalten, wobei jedes Organell in der Lage sein muss, seine Identität und Funktion zu bewahren.

Man unterscheidet zwei wesentliche vesikuläre Transportrouten in der Zelle: Die Endozytose und die Exozytose (Allison und Davies, 1974). Die Endozytose dient der Internalisierung von Rezeptoren und der Aufnahme von Nährstoffen an der Plasmamembran. Proteine oder Rezeptoren, die wieder zur Plasmamembran gebracht werden müssen, werden über die Recycling-Endosomen zurückgewonnen. Dagegen werden Moleküle, die zur Degradation bestimmt sind, über das endosomale System den Lysosomen zugeführt.

Der sekretorische Weg hingegen transportiert *de novo*-synthetisierte Proteine und Lipide vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran oder ihren jeweiligen Bestimmungsort innerhalb der Zelle (z.B. Lysosomen).

### 1.2.1 Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat stellt das Herzstück der sekretorischen Transportmaschinerie in der Zelle dar. Er besteht aus einer Vielzahl von flachen Zisternen (membranumschlossenen Räumen), die in Stapeln miteinander verbunden vorliegen, ohne jedoch zu fusionieren (Palade, 1975; Farquhar und Palade, 1998). Diese Golgi-Stapel formen in Säugetieren das sogenannte Golgi -Band (Barr und Warren, 1996).

Der Golgi-Apparat ist ein polares Organell. Man unterscheidet die mit dem ER in Austausch stehende cis-Seite, die medial-Seite und die trans-Seite, die mit der Plasmamembran und den endozytotischen Kompartimenten interagiert (Griffiths und Simons, 1986; Schweizer *et al.*, 1988). *De novo*-synthetisierte Proteine gelangen auf ihrem Weg aus dem ER in den Golgi -Apparat, wo sie beim Passieren der unterschiedlichen Zisternen durch Anhängen von



z.B. Zuckerresten, modifiziert werden. Am trans-Golgi Netzwerk (TGN) schließlich erfolgt die Sortierung zum jeweiligen Bestimmungsort (Palade, 1975; Munro, 2005).

### 1.2.2 Die Golgi-Matrix

Einige Golgi-lokalisierte Enzyme sind an der Bildung der so genannten Golgi-Matrix beteiligt, die hilfreich für die Erhaltung der dynamischen Struktur des Golgi-Apparates ist. Die proteinreiche Matrix bildet ein Detergenz-unlösliches intrazelluläres Gerüst, an das Glycosyltransferasen binden können und durch welches die Zisternen miteinander verbunden werden (Cluett und Brown, 1992; Slusarewicz *et al.*, 1994). Entdeckt wurde die Golgi-Matrix durch Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA). BFA führt zu einer Blockade des ER-Golgi-Transportes. Dies hat zur Folge, dass die meisten Golgi-lokalisierten Proteine zum ER relokalisieren, während eine Gruppe von Proteinen und tubulovesikulären Membranen zurückbleibt (Seemann *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001).

Diese Matrix-Proteine gehören zur Familie der Golgine und beinhalten alle ein *coiled-coil*-Proteinmotiv, welches ausgedehnte stabförmige Strukturen ausbilden kann (Barr und Short, 2003; Gillingham und Munro, 2003). Ursprünglich wurden Golgine als eine Familie von Golgi-lokalisierenden Autoantigenen identifiziert (Nozawa *et al.*, 2002).

Die Bindungseigenschaften von Golginen an die Golgi-Membran sind vielfältig (Short *et al.*, 2005). Einige Golgine besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne, die direkt an die Golgi-Membran bindet (Golgin-84, Giantin, CASP), andere Golgine sind periphere Membranproteine (Golgin-45, GM130). Sie assoziieren mit dem Golgi-Apparat durch Bindung an Adapterproteine aus der GRASP-Familie (*Golgi reassembly stacking protein*). Diese wiederum binden über eine N-terminale Myristoylkette an die Golgi-Membran. Wieder andere Golgine werden durch kleine GTPasen der ARF-, Rab- oder ARL-Familie (Bicaudal, p115, Golgin-245, Golgin-97) zum Golgi-Apparat rekrutiert.

Am Golgi-Apparat führen Golgine unterschiedliche Funktionen aus. Den Membran-assoziierten Proteinen GRASP65 und GRASP55 wurde in einem zellfreien Ansatz eine Rolle im Aufbau von Golgi-Stapeln zugewiesen (Barr *et al.*, 1997; Shorter *et al.*, 1999). Für das cis-Golgi-Golgin GM130 konnte gezeigt werden, dass es sowohl an der Fusion von Vesikeln mit der Golgi-Membran beteiligt ist, als auch an der Verankerung benachbarter Zisternen (Puthenveedu *et al.*, 2006; Marra *et al.*, 2007).



Die am besten untersuchte Funktion von Golginen ist die Bindung von Transportvesikeln an die Golgi-Membranen. Ankommende Vesikel werden am Golgi-Apparat u.a. durch die Golgine GM130 und p115 gebunden (Barr und Warren, 1996; Nakamura *et al.*, 1997; Lesa *et al.*, 2000). Das periphere Membranprotein p115 lokalisiert zum cis-Golgi, wo es von GM130 gebunden wird. Durch Bindung des z.B. auf COPI-Vesikeln enthaltenem Golgin Giantin an p115 und GM130 entsteht ein ternärer Komplex, der das Vesikel am Golgi-Apparat verankert (Sonnichsen *et al.*, 1998).

Viele Golgine interagieren außerdem mit Rab-Proteinen, allerdings ist die Wirkungsweise der Interaktion weitgehend unbekannt. Die bereits genannten Golgine p115, GM130 und Giantin sind bekannte Interaktionspartner für Rab1-dekorierte Vesikel (Sonnichsen *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Moyer *et al.*, 2001; Beard *et al.*, 2005). Zusätzlich ist Giantin auch ein Effektor von Rab6 (Rosing *et al.*, 2007). Für Rab6 wurde eine Interaktion mit den Golginen Bicaudal-D1 und Bicaudal-D2 am TGN gezeigt, wo sie für die Regulation des retrograden Transportes von den Endosomen zum Golgi-Apparat verantwortlich sind (Matanis *et al.*, 2002; Short *et al.*, 2002). Das integrale cis-Golgi-Protein Golgin-84 kann ebenfalls mit Rab1-transportierten Vesikeln interagieren (Diao *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2003).

### **1.2.3    Beförderung von Vesikeln innerhalb des sekretorischen Transportweges**

Für den Transport von Vesikeln von der cis- zur trans-Seite des Golgi-Apparates wurden zwei Modelle vorgeschlagen: (1) Das Modell des vesikulären Transports und (2) das Modell der Zisternenreifung (Bonfanti *et al.*, 1998; Pelham und Rothman, 2000; Martinez-Menarguez *et al.*, 2001; Mironov *et al.*, 2001; Beznoussenko und Mironov, 2002; Elsner *et al.*, 2003; Losev *et al.*, 2006). Im ersten Modell werden das ER und der Golgi-Apparat als stabile, stationäre Strukturen angesehen. Der Transport erfolgt durch Abschnürung von Vesikeln am ER und am Golgi-Apparat, die ihre Fracht durch Fusion mit ihrer Zielmembran entlassen. Der Rücktransport von ER-Golgi-Apparat-stationären Enzymen erfolgt über einen retrograden Vesikeltransport.

Die bereits vor über 50 Jahren formulierte Zisternenreifung basiert auf der Annahme, dass neu synthetisierte Proteine das ER in membranumgebenen Transportvehikeln verlassen (Grasse, 1957). Am Golgi-Apparat erfolgt keine Entladung des Frachtmaterials, wie beim

vesikulären Transport, sondern die gesamte Struktur reift graduell in eine Golgi-Zisterne. Durch entgegengesetzten (retrograden) vesikulären Transport von Enzymen in die nachrückenden Zisternen, können die einzelnen gesamten Zisternen von der cis- auf die trans-Seite des Golgi-Apparates passieren.

Einzelstehend liefern beide Modelle allerdings keine Erklärung für den Transport großer Moleküle, wie z.B. Procollagen, die aufgrund ihrer Größe nicht von Golgi-Vesikeln transportiert werden können oder das Fehlen von Enzymen in retrograd-transportierten COPI-Vesikeln (Orci *et al.*, 1997; Bonfanti *et al.*, 1998). Eine Kombination beider Modelle scheint die beobachteten Vorgängen am besten wiederzuspiegeln. Einen langsamen Transport von z.B. Makromolekülen durch Zisternenreifung und einen „schnellen Weg“ über verschiedene Populationen von COPI-Vesikeln.

### 1.2.3.1 Formation von Vesikeln

Der Vesikel-vermittelte Transport verläuft grundlegend in vier Schritten. (1) Das Abschnüren des Vesikels von der Donormembran, (2) den Transport in Richtung der Ziellmembran, (3) das Verankern des Vesikels am Bestimmungsort und schließlich (4) die Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran (Rothman, 1994).

Die Vesikelformation wird durch die Aggregation von zytoplasmatischen Proteinen zu einer Hülle eingeleitet. Die drei bekanntesten Familien von Hüllproteinen sind COPI (*coat-protein complex I*), COPII (*coat-protein complex II*) und Clathrin mit den Adaptorproteinkomplexen AP-1 and AP-2 (Schenkman und Orci, 1996). Die COP-Hüllen werden vorrangig in der Exozytose und im Recycling-Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat benutzt, während Clathrin-umhüllte Vesikel vor allem auf endozytotischen- und Recycling-Routen zwischen der Plasmamembran und Lysosomen zu finden sind.

COPII-Vesikel schnüren sich am ER an spezifischen Stellen, den *ER exit sites*, ab. Die Zusammensetzung der Hülle erfolgt durch die sequenzielle Bindung der Sar1p GTPase, des Sec23/24p Komplexes und des Sec13/31p Komplexes (Barlowe *et al.*, 1994). Durch die Polymerisierung der Hülle und Stimulierung der GTPase Aktivität kommt es zu einer Membrankrümmung, aus der sich das Transportvesikel abschnüren kann und in Richtung des Golgi-Apparates transportiert wird (Barlowe *et al.*, 1994; Presley *et al.*, 1997; Pepperkok *et al.*, 2000; Antony *et al.*, 2001). Auf ihrem Weg zum Golgi-Apparat passieren die

Transportvesikel das ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*) (Hauri und Schweizer, 1992; Hauri *et al.*, 2000). Sowohl COPI- als auch COPII-Vesikel assoziieren mit dem ERGIC. Es wird angenommen, dass das ERGIC als erste Instanz zwischen retrogradem und anterogradem Transport unterscheidet (Martinez-Menarguez *et al.*, 1999; Hauri *et al.*, 2000). Der anterograde Transport von Vesikeln vom ERGIC zum Golgi-Apparat erfolgt unter anderem über COPI-negative pre-Golgi-Transporter, die größer als ein Vesikel sind (Presley *et al.*, 1997; Martinez-Menarguez *et al.*, 1999).

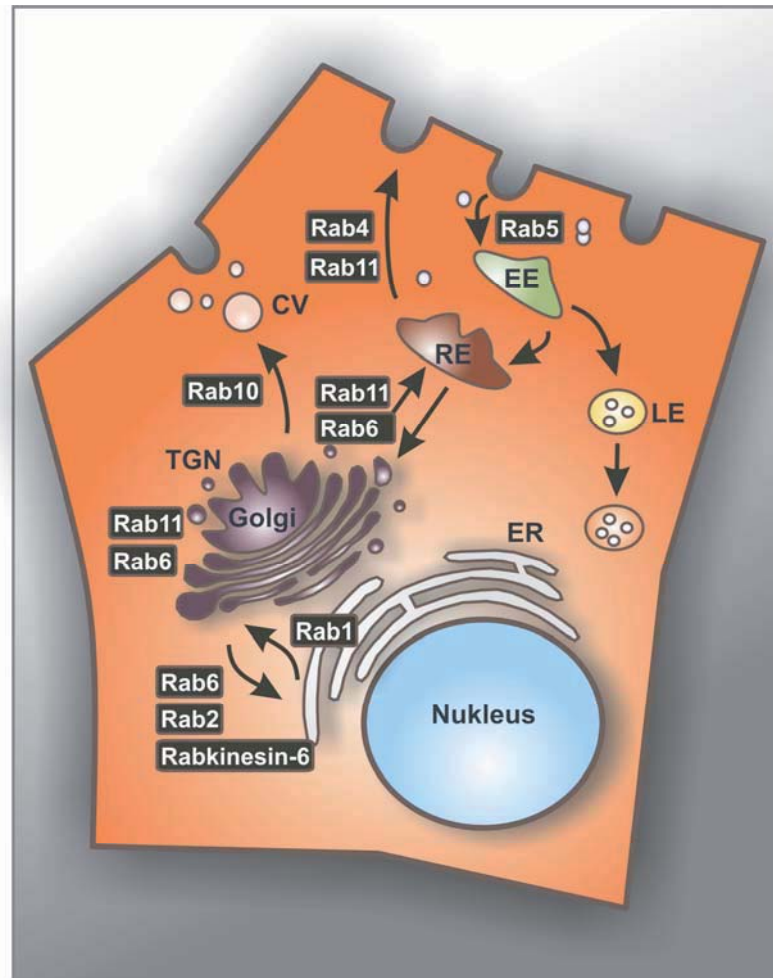
Für die Aufrechterhaltung der Funktion des Golgi-Apparates müssen Proteine und Enzyme, die während des Transportes in andere Organellen oder Golgi-Zisternen gelangen, wieder an ihren ursprünglichen Zielort zurückgelangen. Die Protein-Rückgewinnung aus dem ER oder dem Golgi-Apparat ist ein spezifisch regulierter Prozess, der auf der Anwesenheit von Sortierungssignalen, wie z.B. einer K/HDEL-Sequenz oder einer KKXX-Sequenz (Dilysin), in den Recycling-Proteinen beruht (Pelham, 1988; Barlowe und Schekman, 1993; Letourneur *et al.*, 1994). Die COPI-Hülle interagiert mit dem KKXX-Motiv vieler ER-stationärer Enzyme und ist an deren Rücktransport aus dem Golgi-Apparat beteiligt (Letourneur *et al.*, 1994). Über den Inhalt von COPI-Vesikeln ist bisher allerdings wenig bekannt. 2005 zeigten Warren und seine Mitarbeiter, dass eine über Golgin-84 und CASP gebundene Subpopulation von COPI-Vesikeln keine Rezeptorproteine der p24-Familie beinhalten (Malsam *et al.*, 2005). Die Identifizierung weiterer Vesikelpopulationen könnte zur Aufklärung von Transportrouten von Organell-stationären Molekülen, Transportgut und rückgewonnenen Proteinen und Enzymen beitragen.

Die Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln erfolgt an der Plasmamembran, am TGN und an den Endosomen. Die Clathrin-Hülle besteht aus einer als „Triskelion“ bezeichneten trimeren Struktur (Crowther und Pearse, 1981). Wie bereits beim Aufbau der COPII-Hülle beschrieben, führt der Zusammenbau der Clathrin-Hülle zur Deformierung der Membran und zur Ablösung eines Vesikels (Ford *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2004).

### 1.2.3.2 Rab-Protein-vermittelter Vesikeltransport

Hat sich ein Vesikel erfolgreich gebildet und abgeschnürt, kann dieses zu seinem Bestimmungsort transportiert werden. Kleine GTPasen der Rab-Familie übernehmen eine Schlüsselrolle in der Regulierung dieser Transportprozesse (Zerial und McBride, 2001). Sie vermitteln nicht nur die Formation, sondern auch den Transport und die Fusion von endozytotischen- und exozytotischen Vesikeln. Rab-Proteine (*ras in brain*) gehören zur Gruppe der kleinen GTPasen aus der Ras-Familie. Inzwischen sind im Menschen über 60 Vertreter bekannt (Schultz *et al.*, 2000; Pereira-Leal und Seabra, 2001). Die Expression der unterschiedlichen Vertreter ist dabei sowohl gewebespezifisch, als auch zeitlich reguliert. Innerhalb der Zelle lokalisieren Rab-Proteine zu unterschiedlichen Kompartimenten, wo sie durch Interaktionen mit anderen Effektorproteinen Membran-Mikrodomänen ausbilden und mannigfaltige Funktionen in der Sortierung, dem Transport, der Verankerung und der Fusion von Vesikeln ausüben (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997; Sonnichsen *et al.*, 2000; Grosshans *et al.*, 2006).

Für einige ausgewählte Rab-Proteine sind hier die jeweiligen Zielkompartimente genannt: Rab5 lokalisiert zu den frühen Endosomen, Rab7 und Rab9 dekorieren späte Endosomen und Lysosomen, Rab1, Rab2, und Rab6 regulieren den Transport zwischen ER und Golgi, während Rab4 und Rab11 Prozesse an Recycling-Endosomen steuern (Abb. 1.3).



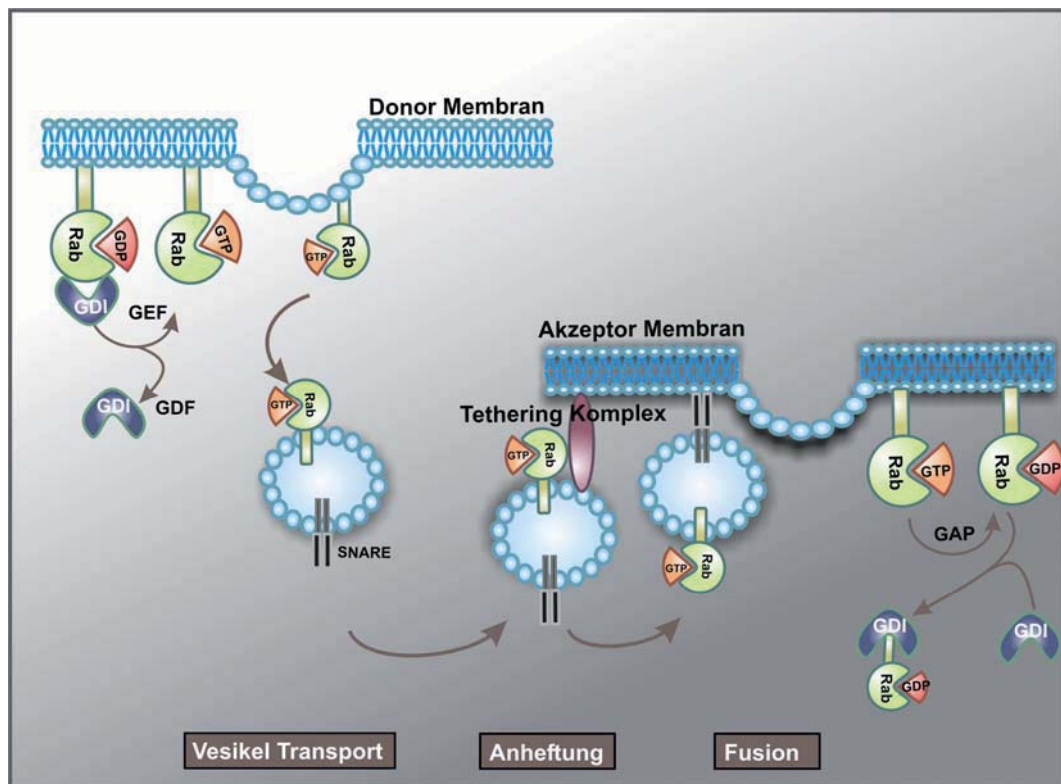
### Abb. 1.3 Lokalisation von Rab-Proteinen innerhalb der Zelle

Siehe Text für Erklärung.

ER = endoplasmatisches Retikulum, TGN = trans-Golgi Netzwerk, EE =frühe Endosomen, RE = Recycling-Endosomen, LE = späte Endosomen, CV = *coated vesicles*

Rab-Proteine agieren als molekulare Schalter. Sie wechseln zwischen einer GDP-gebundenen, zytosolischen und einer GTP-gebundenen, membranständigen Form (Abb. 1.4) (Zerial und McBride, 2001). Dabei besitzen sie allerdings nur eine schwache intrinsische GTP-Hydrolyse Aktivität. Diese wird durch Bindung von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) katalysiert (Fukui *et al.*, 1997; Cuif *et al.*, 1999). Auch der Nukleotidaustausch erfolgt durch Bindung von Guanin-Nukleotidaustausch-Faktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs). In ihrem GDP-gebundenen Zustand sind Rab-Proteine löslich und befinden sich, gebunden am Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*, GDI), im Zytosol (Soldati *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1993). An der Zielmembran können sie über Interaktionen mit dem GDI-Verdrängungsfaktor (*GDI displacement factor*,

GDP) freigesetzt werden und mittels ihres C-terminalen Geranylgeranyl-Lipidankers in die Membran inserieren (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997).



**Abb. 1.4 Rab-Protein GTPase Zyklus**

Siehe Text für Erklärung.

GTP = Guanosin-Tri-Phosphat, GDP = Guanosin-Di-Phosphat, GEF = Guanin-Nukleotidaustausch-Faktor, GAP = GTPase-aktivierendes Protein, GDI = Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor, GDF = GDI-Verdrängungsfaktor

Der Transport von Vesikeln zu ihrer Zielmembran erfolgt auf Aktin- oder Mikrotubuli-abhängigen Routen durch das Zytoplasma. Die Beförderung auf diesen Strecken erfordert spezielle Motorproteine, die Myosine, Kinesine oder Dyneine (Mallik und Gross, 2004). Kinesine transportieren Vesikel in Richtung des Plus-Endes von Mikrotubuli zur Zellperipherie, während Dyneine Minusmotoren sind und Vesikel zum Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) und Nukleus transportieren (Paschal *et al.*, 1987; Schroer *et al.*, 1989; Hirokawa *et al.*, 1991). Motorproteine können direkt oder indirekt an Rab-Proteine gebunden sein. Für das Motorprotein Rabkinesin-6 konnte gezeigt werden, dass es direkt an Rab6 bindet und damit den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum ER begünstigt (Echard

*et al.*, 1998). Rab27a-positive Melanosomen hingegen werden über den Effektor Melanophilin an das Aktin-Motorprotein Myosin-Va gebunden (Strom *et al.*, 2002).

### 1.2.3.3 Verankerung und Fusion von Vesikeln an der Zielmembran

Die letzten wichtigen Schritte des Vesikel-vermittelten Transportes sind die Verankerung an der Zielmembran und die Fusion, der in räumliche Nähe gebrachten Membranen. Die Verankerung des Vesikels wird z.B. durch Interaktionen mit so genannten *tether proteins*, wie p115 erreicht (Sonnichsen *et al.*, 1998).

Zur Fusion des Vesikel mit der Zielmembran müssen sich die so genannten SNARE-Komplexe (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) des Vesikels mit denen der Zielmembran paaren (Rothman, 1994). SNARE-Proteine sind Transmembranproteine, die eine Verwandtschaft zu den drei neuronalen Proteinen Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 aufzeigen. Alle SNARE-Proteine besitzen eine konservierte 60-70 Aminosäuren lange Domäne, das SNARE-Motiv, dass in mehreren Wiederholungen vorliegen kann (Bock *et al.*, 2001). Jede intrazelluläre Membran, und damit auch jeder Vesikel, ist mit einem bestimmten Set an Membranfusion-ermöglichenden SNARE-Proteinen ausgestattet. Eingeleitet wird die Fusion eines Vesikels mit der Bindung der drei, auf einem Vesikel vorkommenden, helikalen v-SNAREs (*vesicle-SNARE*) an ein helikales t-SNARE (*target-SNARE*) auf der Zielmembran (Sollner *et al.*, 1993b; Rothman, 1994). Diese Konstellation bildet ein stabiles Vier-Helix-Bündel, wessen Aufbau genug Aktivierungsenergie freisetzt, um den Fusionsprozess durchzuführen (Fasshauer *et al.*, 1997; Yang und Huang, 2002). Der Komplex wird nach der Fusion durch die ATPase NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Factor*) und den Kofaktor SNAP (*soluble NSF attachment proteins*) aufgelöst (Sollner *et al.*, 1993a). Die einzelnen Komponenten werden anschließend neuen Transport- und Fusionszyklen zugeführt.

### 1.2.4 Transport von Lipiden in eukaryontischen Zellen

Für den Aufbau von Membranen sind nicht nur Proteine, sondern auch eine Vielzahl von Lipiden notwendig. Die Lipid-Biosynthese erfolgt hauptsächlich im ER. Phospholipide, Ceramide und Cholesterol werden hier synthetisiert (Kent, 1995; Chang *et al.*, 2006). Der Transport zum Golgi-Apparat verläuft oft analog über Vesikel, allerdings wurden auch nicht-



vesikuläre Transportmechanismen beschrieben. So konnte ein multifunktionelles Protein, CERT, identifiziert werden, dass für den Transport von Ceramiden vom ER zum Golgi-Apparat zuständig ist (Hanada *et al.*, 2003). Im Golgi-Apparat können Ceramide durch die Enzyme Sphingomyelin-Synthase, UDP-Gal:Glucosylceramid-beta-1,4-Galactosyltransferase und Glucosylceramid-Synthase in Sphingomyeline, Lactosylceramide oder Glycosphingolipide konvertiert werden (Futerman und Riezman, 2005).

Cholesterol wird in eukaryontischen Zellen über zwei Wege akquiriert: Endogen, über *de novo*-Synthese oder exogen, über die Aufnahme aus der Umgebung durch LDL (*low density lipoprotein*) und LDL-Rezeptoren. Die spezifische Lipid- und Protein-Komposition jedes Organells, vor allem der Cholesterol-Level, unterliegt einer strengen Regulation. Defekte im Cholesterol-Membrantransport können sich in der Niemann-Pick Typ C (NPC) Krankheit manifestieren (Pentchev *et al.*, 1985). Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten neurodegenerativen Erkrankung kommt es im Zuge eines gestörten LDL-abhängigen Cholesterol-Transportes zu einer intrazellulären Anreicherung von Cholesterylestern in endozytotischen Organellen. Durch Überexpression von Rab9, Rab8 und Rab7 konnte der NPC-Phänotyp komplementiert werden (Choudhury *et al.*, 2002; Linder *et al.*, 2007).

### 1.3 Chlamydiale Interaktionen mit den Transportwegen der Wirtszelle

Die obligat intrazelluläre Lebensweise zwingt die Chlamydien mit der Wirtszelle zu interagieren. Diese Interaktionen sind vielfältig und beginnen bereits während der Aufnahme in die Zelle.

In die Wirtszelle transloziertes bakterielles Tarp (*Translocated actin recruiting phosphoprotein*) wird dabei durch zelluläre Kinasen phosphoryliert und setzt eine Signalkaskade in Gang, die eine Modulation des Zytoskeletts zur Folge hat (Clifton *et al.*, 2005). Nach dem Eintritt in die Zelle konnten in der sich gebildeten Inklusionsmembran mehrere Chlamydien-Proteine nachgewiesen werden, die als *inclusion membrane proteins* (Inc-Proteine) bezeichnet werden (Rockey *et al.*, 1995; Bannantine *et al.*, 1998; Bannantine und Rockey, 1999; Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). Die Funktion dieser Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Inc-Proteine unter anderem für die homotype Fusion von Inklusionen wichtig sind (Hackstadt *et al.*, 1999; Delevoye *et al.*, 2004; Delevoye *et al.*, 2008). Des Weiteren konnten keine wirtszellspezifischen endosomalen oder



lysosomalen Marker auf der Inklusionsmembran gefunden werden, die auf Interaktionen mit endozytotischen Routen schließen lassen (Friis, 1972; Heinzen *et al.*, 1996; Scidmore *et al.*, 2003). Chlamydien konkurrieren allerdings mit der Wirtszelle um die Aufnahme von Eisen aus den Recycling-Endosomen. Dies konnte durch Assoziation von Transferrin/Transferrin-Rezeptor beinhaltenden Vesikeln an der Inklusionsmembran beobachtet werden (Scidmore *et al.*, 1996b; van Ooij *et al.*, 1997; Al Younes *et al.*, 2001).

Über Mikrotubuli-abhängige Routen gelangt die Inklusion zum MTOC. Dieser Transport ähnelt der Beförderung von zellulären Vesikeln und ist Dynein-abhängig, jedoch p50-Dynamitin-unabhängig (Grieshaber *et al.*, 2003). Am peri-Golgi-Apparat angekommen, beginnen Chlamydien Sphingolipide und Cholesterol aus dem Golgi-Apparat zu akquirieren (Hackstadt *et al.*, 1996; Scidmore *et al.*, 1996a; Wylie *et al.*, 1997; Carabeo *et al.*, 2003). Cholesterol, Glycerophospholipide und Glycosphingolipide werden in der Regel nur von eukaryontischen Zellen synthetisiert. Erstaunlicherweise können diese Lipide in der bakteriellen Zellwand aufgereinigter EK detektiert werden (Hatch und McClarty, 1998). Wird dieser Transport unterbrochen, wirkt sich dies negativ auf das Chlamydienwachstum aus. Der molekulare Mechanismus der Lipidinkorporation in die Bakterien ist allerdings wenig untersucht.

Der Transport von Lipiden und Membranen in Form von Vesikeln wird innerhalb der Wirtszelle vorwiegend durch Rab-Proteine reguliert. Für viele intrazelluläre Organismen konnten Interaktionen mit Rab-Proteinen gezeigt werden, die die bakterielle Entwicklung sichern. Chlamydien sind in der Lage, selektiv Rab-Proteine zu rekrutieren. *C. trachomatis* rekrutiert Rab1, Rab4, Rab6 und Rab11, während *Cp. pneumoniae* Rab1, Rab4 und Rab11 heranzieht, aber nicht mit Rab6 interagiert. Zusätzlich ist die Interaktion mit Rab10 spezifisch für *Cp. pneumoniae* (Rzomp *et al.*, 2003). Die Relevanz und funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung für eine erfolgreiche chlamydiale Vermehrung innerhalb der Wirtszelle ist bislang ungeklärt.

Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass die Inc-Proteine CT229 von *C. trachomatis* und Cpn0585 von *Cp. pneumoniae* mit zellulären Rab-Proteinen interagieren (Cortes *et al.*, 2007). Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass Chlamydien hauptsächlich mit Organellen des sekretorischen Transportweges interagieren, während sie die Fusion mit endozytotischen Kompartimenten verhindern.

## 1.4 siRNA-Technologie

Die spezifische Herabregulation von Genen über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) konnte erstmals von Andrew Fire und Craig Mello durch Injektion doppelsträngiger RNA in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden. Dabei handelt sich um einen post-transkriptionellen Prozess, bei dem die Expression eines Gens sequenzspezifisch inhibiert werden kann (Fire *et al.*, 1998). Die eingebrachten langen doppelsträngigen RNA-Moleküle werden über das RNase-III-Enzym DICER in kleine Nukleotidfragmente, so genannte siRNAs (*short-interfering RNAs*), von 19-21 bp Länge geschnitten und in den Protein-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. Im RISC wird die doppelsträngige siRNA aufgewunden und der Antisense-Strang als Matrize für die spezifische Bindung der Ziel-mRNA verwendet, welche anschließend durch Argonaut-2 geschnitten wird. Nach vollständiger Degradation der mRNA durch weitere Nukleasen und einer von der Halbwertszeit des Zielproteins abhängigen Karenzzeit kommt es zum Verlust des Zielproteins in der Zelle (Hannon, 2002).

Auf Grundlage dieser Beobachtungen konnten Tuschl und seine Mitarbeiter durch das Einbringen synthetischer 21 bp langer siRNAs auch in Säugerzellen spezifisch Proteine ausschalten (Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b). Diese Weiterentwicklung ermöglichte die gezielte Erzeugung von Proteinfunktionsverlusten und damit die systematische Analyse von Proteinfunktionen, ohne dabei auf die ektopische Expression rekombinanter Proteine angewiesen zu sein.

Bei Anwendung der RNAi ist das Design der siRNA von besonderer Bedeutung. Dabei muss besonders auf bestimmte Sequenzeigenschaften und die beste Zielregion in der mRNA geachtet werden. Ungünstige Sekundärstrukturen durch Palindrome oder Wiederholungen können die Funktionalität beeinträchtigen (Reynolds *et al.*, 2004). Zudem kann bereits eine Homologie von 11-15 aufeinander folgenden Nukleotiden zwischen verschiedenen Genen ausreichen, um bei Verwendung der komplementären siRNA Zielgenunabhängige Sequenzen spezifisch herab zu regulieren (Jackson *et al.*, 2003). Um diese so genannten *off-target*-Effekte als Ursache für einen Phänotyp auszuschließen, sollten möglichst mehrere siRNAs für die Herunterregulation eines Gens verwendet werden. Haben diese ähnliche Phänotypen zur Folge und korreliert die Ausprägung der Phänotypen mit der Reduktion der

Proteinmenge, beruhen diese mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf dem Verlust des eigentlichen Zielproteins.

Die Verwendung der RNAi bietet in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit spezifische Wirtszellproteine herunter zu regulieren. Dadurch können Auswirkungen auf die chlamydiale Entwicklung untersucht werden.

## 1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Struktur des Golgi-Apparates in der Chlamydien-Infektion analysiert werden.

Zunächst sollte untersucht werden, welche Auswirkungen der RNAi-vermittelte funktionelle Ausfalls bestimmter Golgi-Strukturproteine auf das Wachstum der Chlamydien hat.

Für mehrere Golgi-Strukturproteine sind Wechselwirkungen mit Rab-Proteinen aufgezeigt worden, und es konnten bereits Interaktionen der Inklusion mit Rab-Proteinen beschrieben werden. Die Relevanz diese Interaktionen für eine erfolgreiche Infektion, blieb bisher allerdings ungeklärt. Durch Herunterregulation unterschiedlicher Rab-Proteine mittels RNAi sollte deren Bedeutung für die chlamydiale Vermehrung und Entwicklung und die Golgi-Struktur bestimmt werden.

Die bakterielle Versorgung mit Lipiden und anderen Nährstoffen spielt eine zentrale Rolle in den Interaktionen von Chlamydien mit den Transportwegen der Wirtszelle. Über den Mechanismus der Lipidinkorporation ist noch wenig bekannt. Untersuchungen zum Transport von Sphingolipiden aus dem Golgi-Apparat in die Inklusion in *knock down*-Zellen sollten Aufschluss darüber geben, ob Rab-Proteine für die bakterielle Lipidzufuhr wichtig sind.

Der simultane Verlust entscheidender Proteine aus dem Rab-Protein-vermittelten Transportweg und dem Golgi-Apparat sollte abschließend bisher nicht gekannte Abhängigkeiten in der Infektion aufzeigen.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von ROTH, SIGMA-ALDRICH oder MERCK bezogen.

### 2.2 Geräte

Die Laborausstattung entspricht modernen Laborstandards.

Automatisches Fluoreszenzmikroskop Scan <sup>R</sup>	OLYMPUS
BioRobot <sup>®</sup> 8000 System	QIAGEN
ELISA-Photometer SpectraMax190	MOLECULAR DEVICES
Fluoreszenzmikroskop	OLYMPUS
Laser Scanning Mikroskop (Kr-Ar Laser) TCS SP-1	LEICA
Lebendzell-Mikroskop TCS SP-5	LEICA
Transmissionselektronenmikroskop Leo 906E	CARL ZEISS

### 2.3 Verwendete Datenbanken und Programme

**Adobe Photoshop 11.0** Bildbearbeitungsprogramm

**BCM search launcher** <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> BCM (Baylor College of Medicine) search launcher

**BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>

**BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer** Programm zur Generierung von shRNA-Sequenzen

**Corel Draw 11.0** Grafikprogramm

**ImageJ** Bildverarbeitungsprogramm zum Vermessen von Strukturen auf mikroskopischen Aufnahmen

**LAF lite** Software am Lebendzell-Mikroskop TCS SP-5

**MetaMorph** Bildverarbeitungsprogramm für die konfokale Lebendzellmikroskopie

**NCBI Homepage:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Scan<sup>R</sup> Software** Software für das automatische Mikroskop

## 2.4 Zellkultur

### Zelllinien

HeLa	Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
HEp-2	Larynxepithel-Karzinom (human), HeLa-kontaminiert	ATCC: CCL-23

### Wachstumsmedium für alle verwendeten Zelllinien

RPMI	GIBCO BRL
10% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

### Weitere Zellkulturmaterialien

OptiMEM	GIBCO BRL
PBS	GIBCO BRL
Trypsin/EDTA	GIBCO BRL
Zellkulturflaschen	TPP

### Methode

Die obligat intrazelluläre Lebensweise von Chlamydien erfordert eine besonders sorgfältige Zellkultivierung. Alle verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Wachstumsmedium vermehrt und in regelmäßigen Abständen in neue Kultivierungsflaschen passagiert. Das Ablösen der Zellen von der Matrix erfolgte durch Inkubation mit Trypsin für 2-5 Min. Routinemäßig erfolgte alle vier bis sechs Wochen eine PCR-Untersuchung auf Kontaminationen mit *Mycoplasma spp.* Nach der 12-ten Passage wurden die Zellen verworfen, um Passage-abhängige Effekte auszuschließen.

## 2.5 Infektionen von Zellen mit *C. trachomatis*

### Zelllinien

HeLa	Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
HEp-2	Larynxepithel-Karzinom (human), HeLa-kontaminiert	ATCC: CCL-23

### Bakterienstämme

<i>Chlamydia trachomatis</i> L2	lymphatisches Isolat	ATCC: VR-902B
---------------------------------	----------------------	---------------

**Infektionsmedium**

RPMI	GIBCO BRL
5% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

**Zellkulturmaterial**

6- und 12-Kalotten-Mikrotiterplatten	TPP
--------------------------------------	-----

**Methode**

Für die Infektion mit Chlamydien wurden die jeweiligen Zellen in 6- oder 12-Kalotten-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Infektion betrug in jeder 6- oder 12-Kalotten-Mikrotiterplatte ungefähr 80%. Zur Vorbereitung der Infektion wurden die jeweiligen Zellen zweimal mit Infektionsmedium gewaschen. Die EK wurden in der jeweils angegebenen MOI in Infektionsmedium verdünnt und 1 ml (pro Kalotte einer 6-Kalotten-Mikrotiterplatte) bzw. 500 µl (pro Kalotte einer 12-Kalotten-Mikrotiterplatte) als Inokulum auf den Zellen verteilt und zwei Stunden bei 35°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit frischem Infektionsmedium überschichtet und den jeweiligen Versuchsbedingungen entsprechend bis zu zwei Tage bei 35°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

**2.6 Herstellung von *C. trachomatis*-Stammlösungen****Zelllinie**

HeLa Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
-------------------------------------	-------------

**Bakterienstämme**

<i>Chlamydia trachomatis</i> L2	lymphatisches Isolat ATCC: VR-902B
---------------------------------	------------------------------------

**Infektionsmedium**

RPMI	GIBCO BRL
5% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

**SPG-Puffer**

PBS, 0,25 M Saccharose
------------------------

**Weiteres Material**

Spritze mit 26G Kanüle
Glasperlen (2,2 mm bis 3,4 mm)

## Methode

Konfluente HeLa-Zellen mehrerer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (5-10 Stück) wurden mit *C. trachomatis* (MOI 3) infiziert und nach zwei Tagen mit Glasperlen (2,2 mm bis 3,4 mm) mechanisch abgelöst. Das Lysat wurde in mit Glasperlen befüllte Röhrchen überführt und drei Minuten gevortext. Dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen und die infektiösen EK freigesetzt. Zelltrümmer und Kerne wurde in einem anschließenden Zentrifugationsschritt (500 x g, 10 Min. bei 4°C) entfernt. Die Bakterien wurden in einem letzten Zentrifugationsschritt (4800 x g, 60 Min. bei 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit SPG-Puffer gewaschen und schließlich mit Hilfe einer Spritze (26G Kanüle) in SPG-Puffer resuspendiert und aliquotiert. Die Aliquots wurden erst drei bis vier Stunden bei 4°C und anschließend bei -80°C gelagert und für jedes Experiment frisch aufgetaut.

## 2.7 Bestimmung des *C. trachomatis*-Titers

### Zelllinie

HeLa Zervixepithel-Karzinom (human) ATCC: CCL-2

### Bakterienstämme

*Chlamydia trachomatis* L2 lymphatisches Isolat ATCC: VR-902B

### Infektionsmedium

RPMI GIBCO BRL  
5% FKS, hitzeinaktiviert BIOCHROM

### Lösungen

Tab.2.1 verwendete Lösungen für die Immunfluoreszenz

LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H <sub>2</sub> O, über Nacht quellen lassen, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5 unter Rühren auf 60°C erhitzen, danach Lösung bei 4000 UpM zentrifugieren
4% Paraformaldehyd (PFA)	8 g PFA, 20 ml 10x PBS, 8 g Saccharose, ad 200 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
10x PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 2,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Permeabilisierungspuffer	0,2% BSA in PBS, 0,2% Triton X-100

**Antikörper****Tab.2.2 Primärantikörper für die Bestimmung des *C. trachomatis*-Titers**

ANTIKÖRPER	SPEZIES	HERSTELLER
Hsp60 (A57-E4)	Maus	ALEXIS

**Tab.2.3 Sekundärantikörper für die Bestimmung des *C. trachomatis*-Titers**

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	SPEZIES	HERSTELLER
Fluoreszierende sekundäre Cy-Antikörper, Cy3 -konjugiert	Maus	Ziege	MOLECULAR PROBES

**Weiteres Material**

12-Kalotten-Mikrotiterplatte	TPP
Deckgläschen	Marienfeld
Objektträger	

**Methode**

Der Titer der Bakterienstammlösung wurde durch serielle Verdünnung bestimmt. Dazu wurden HeLa Zellen in eine 24-Kalotten-Mikrotiterplatte mit Deckgläschen ausgesät. Diese Zellen wurden mit den seriellen Verdünnungen der Bakterienlösung (je 250 µl pro Kalotte) in Infektionsmedium infiziert und 24 h *p.i.* mit 2% PFA für 30 Min. bei RT fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 30 Min. mit Permeabilisierungspuffer und für je eine weitere Stunde mit einem spezifischen Chlamydien-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. Dazu wurde eine Primärantikörper-Lösung in PBS/0,2% BSA hergestellt und 20 µl auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellen-bewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen wieder zurück in die Mikrotiterplatte überführt und dreimal für 10 Min. mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper erfolgte wie für den Erstantikörper beschrieben, allerdings unter Lichtausschluss. Die fertigen Präparate wurden abschließend mit Mowiol auf einem Objektträger eingedeckt. Die Auszählung der gefärbten Inklusionen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (40x Vergrößerung). Pro Verdünnung wurden zehn Gesichtsfelder erfasst. Theoretisch sollte jede Inklusion auf die Infektion mit einem EK zurückzuführen sein. Die IFU (*inclusion forming units*) konnte mit folgender Formel bestimmt werden.



$$\text{IFU/ml} = [\text{Inklusionen/Sichtfeld}] \times 2975,21 [\text{Flächenfaktor}] \times \text{Verdünnung} \times 4 \text{ (Infektionsvolumen in ml)}$$

Die verwendeten Bakterienstocks wurden zusätzlich auf Kontaminationen mit *Mycoplasma* spp. untersucht (Polymerase-Ketten-Reaktion).

## 2.8 Quantifizierung der primären Infektion

### Zelllinien

HeLa Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
Luciferase-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit
Rab6KD-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit
Rab11KD-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit

### Bakterienstämme

<i>Chlamydia trachomatis</i> L2	lymphatisches Isolat ATCC: VR-902B
---------------------------------	------------------------------------

### Infektionsmedium

RPMI	GIBCO BRL
5% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

### Fixierung

Methanol (MeOH)

### Lösungen

**Tab.2.4 verwendete Lösungen für die Quantifizierung der primären Infektion**

LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H <sub>2</sub> O, über Nacht quellen lassen, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5 unter Rühren auf 60°C erhitzen, danach Lösung bei 4000 UpM zentrifugieren
10x PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 2,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Permeabilisierungspuffer	0,2% BSA in PBS, 0,2% Triton X-100

**Antikörper****Tab.2.5 Primärantikörper für die Quantifizierung der primären Infektion**

ANTIKÖRPER	SPEZIES	HERSTELLER
MOMP	Maus	UNIVERSITY OF WASHINGTON
Hoechst-Reagenz		SIGMA

**Tab.2.6 Sekundärantikörper für die Quantifizierung der primären Infektion**

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	SPEZIES	HERSTELLER
Fluoreszierende sekundäre Cy-Antikörper, Cy3 -konjugiert	Maus	Ziege	MOLECULAR PROBES

**Weiteres Material**

24-Kalotten Mikrotiterplatten	TPP
-------------------------------	-----

**Methode**

Die Primärinfektion wurde durch Bestimmung der gebildeten Inklusionen pro Zelle mit dem automatischen Mikroskop quantifiziert. Dazu wurden die stabil transduzierten Zelllinien Luciferase-HeLa, Rab11KD-HeLa und Rab6KD-HeLa in 24-Kalotten-Platten ausgesät und für 24 h mit *C. trachomatis* L2 MOI 1, MOI 0,5, MOI 0,25, MOI 0,125 infiziert. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem MeOH für 5 Min. fixiert und über Nacht in 70% EtOH bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Proben mit dem spezifischen Antikörper gegen chlamydiales MOMP. Dazu wurden die Zellen zunächst 30 Min. mit 0,2% BSA blockiert und anschließend für eine Stunde mit dem Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-konjugierter Antikörper verwendet. Zur Dektection der Zellkerne wurde der Antikörper-Lösung HOECHST beigefügt. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PBS überschichtet. Die Bildaufnahmen erfolgten an einem automatischen Scan<sup>R</sup>-Mikroskop. In jeder Kalotte wurden 6 Bilder für die Kanäle Rot (Inklusion) und Blau (Zellkerne) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der ScanR Software. Die Anzahl der Inklusionen pro Anzahl der Zellkerne wurde quantifiziert und als Diagramm dargestellt.

## 2.9 Bestimmung der Infektivität von Chlamydien

### Zelllinien

HeLa	Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
HEp-2	Larynxepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-23
	HeLa-kontaminiert	
Luciferase-HeLa		hergestellt in dieser Arbeit
Rab6KD-HeLa		hergestellt in dieser Arbeit
Rab11KD-HeLa		hergestellt in dieser Arbeit

### Bakterienstämme

<i>Chlamydia trachomatis</i> L2	lymphatisches Isolat	ATCC: VR-902B
---------------------------------	----------------------	---------------

### Infektionsmedium

RPMI	GIBCO BRL
5% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

### Lösungen

Tab.2.7 verwendete Lösungen für die Immunfluoreszenz

LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H <sub>2</sub> O, über Nacht quellen lassen, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5 unter Rühren auf 60°C erhitzen, danach Lösung bei 4000 UpM zentrifugieren
4% Paraformaldehyd (PFA)	8 g PFA, 20 ml 10x PBS, 8 g Saccharose, ad 200 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
10x PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 2,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Permeabilisierungspuffer	0,2% BSA in PBS, 0,2% Triton X-100

### Antikörper

Tab.2.8 Primärantikörper für die Bestimmung der Infektivität

ANTIKÖRPER	SPEZIES	HERSTELLER
Hsp60 (A57-E4)	Maus	ALEXIS
MOMP	Maus	UNIVERSITY OF WASHINGTON

Tab.2.9 Sekundärantikörper für die Bestimmung der Infektivität

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	SPEZIES	HERSTELLER
Fluoreszierende sekundäre Cy-Antikörper, Cy3-konjugiert	Maus	Ziege	MOLECULAR PROBES

**Weiteres Material**

24-Kalotten-Mikrotiterplatten  
Deckgläschen  
Objektträger

TPP  
Marienfeld

**Methode**

Zur Bestimmung der Infektivität der chlamydialen Nachkommenschaft wurde eine Sekundärinfektion durchgeführt. Dazu wurden siRNA-transfizierte Zellen oder stabil transduzierte Zellen für 48 h mit *C. trachomatis* L2 infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Glasperlen lysiert, um die infektiösen EK frei zu setzen. HeLa Zellen wurden in 24-Kalotten-Mikrotiterplatte auf Deckgläschen ausgesät und darauf die EBs in seriellen Verdünnungen titriert. Nach 24 h wurden die Zellen mit für 30 Min. mit 2% Pfa fixiert und für eine weitere halbe Stunde mit Permeabilisierungspuffer behandelt. Der Primärantikörper wurde in einer PBS/0,2% BSA Lösung verdünnt und 20 µl dieser Lösung auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellen-bewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen wieder zurück in die Mikrotiterplatte überführt und dreimal für 10 Min. mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte wie für den Erstantikörper beschrieben, allerdings unter Lichtausschluss. Um die Infektivität der Nachkommen zu bestimmen, wurden die Inklusionen in zehn Gesichtsfeldern pro Verdünnung unter einem Fluoreszenzmikroskop (40x) gezählt und die IFU/ml mit folgender Formel berechnet:

$$\text{IFU/ml} = [\text{Inklusionen/Sichtfeld}] \times 2975,21 [\text{Flächenfaktor}] \times \text{Verdünnung} \times 4 \text{ (Infektionsvolumen in ml)}$$

Letztlich wurden die ermittelten Werte mit Hilfe der LDH-Bestimmung auf die IFU pro  $10^6$  Zellen normalisiert (siehe Abschnitt 2.10).

## 2.10 Bestimmung der Zellzahl mittels des LDH Tests

### Gebrauchsfertige Lösung

Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)

ROCHE

### Weiteres Material

96-Kalotten-Mikrotiterplatte

TPP

### Methode

Die Behandlung von Zellen mit siRNAs zeigte in einigen Fällen Auswirkungen auf die Dauer der Zellteilung. Um die Daten aus der Infektivitätsuntersuchung normalisieren zu können, wurde die Zellzahl im Infektionslysat/primären Infektion mit Hilfe des Cytotoxicity Detektion Kit nach Herstellerangaben bestimmt. Das Nachweissystem beruht auf der Freisetzung zytoplasmatischer Lactat-Dehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberstand durch Beschädigung der Plasmamembran. Dies korreliert mit der Bildung eines Formazan-Farbstoffes, welcher proportional zur Anzahl der lysierten Zellen ist. Für die Durchführung dieses Tests wurden 500 µl des Probenlysats der Infektivitätsbestimmung abgenommen und durch Zentrifugation (10 Min. bei 270x g) von Zelltrümmern befreit. 100 µl einer 1:50 Verdünnung wurden auf eine Mikrotiterplatte übertragen und mit 100 µl Reaktionslösung versetzt. Als Eichkurve dienten serielle Verdünnungen lysierter HeLa-Zellen. Die Inkubation erfolgte bei RT unter Lichtausschluss und wurde nach 20-30 Min. durch Zugabe von 50 µl *Stop-solution* abgestoppt. Abschließend wurde die Absorption am ELISA-Photometer bei 450 nm ausgelesen und die Zellzahl der Probe bestimmt.

## 2.11 Transfektion von siRNA

### Gebrauchsfertige Lösungen

RNAiFect Transfection

QIAGEN

### Zelllinien

HeLa	Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
HEp-2	Larynxepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-23
	HeLa-kontaminiert	

**Zelllinien**

Luciferase-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit
Rab6KD-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit
Rab11KD-HeLa	hergestellt in dieser Arbeit

**Wachstumsmedium**

RPMI	GIBCO BRL
10% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM

**Weiteres Material**

12-Kalotten-Mikrotiterplatten	TPP
-------------------------------	-----

**siRNA****Tab. 2.10 Sequenzdaten der verwendeten siRNAs**

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (xyN19)	HERSTELLER
CASP	CAGCGCCTGCACGATATTGAA	QIAGEN
Giantin	AACTTCATGCGAAGGCCAAAT	QIAGEN
GM130	CAGGCTGGAGTTATACAAGAA	QIAGEN
Golgin-84	CTGAGTTTAGTGGTCCTAATA	QIAGEN
Gpp130	CAGGAGGACAATGTTGATGAA	QIAGEN
Luciferase	AACUUACGCUGAGUACUUCGA	QIAGEN
p115	AACCCACCAAGACCGGCAATT	QIAGEN
p230	CAGGAAATACATGAAATCCAA	QIAGEN
Rab1	GTCCAGCATGAATCCCGAATA	QIAGEN
Rab2	GGCGACACAGGTGTTGGTAAA	QIAGEN
Rab4	AAUGCAGGAACUGGCAAUUCU	QIAGEN
Rab5	ATTCATGGAGACATCCGCTAA	QIAGEN
Rab6	CAGATTCATGTATGACAGTTT	QIAGEN
Rab10	ACCTGCGTCCTTTTTCGTTTT	QIAGEN
Rab11	AAGAGUAAUCUCCUGUCUCGA	QIAGEN
Rabkinesin-6	AAGGCCAGGTTTCTGCCAAAA	QIAGEN

**Methode**

Die Herunterregulation der endogenen Genexpression erfolgte mit den angegebenen *small interfering* RNA (siRNA) Oligonukleotiden. Für das Design der siRNAs wurde ein speziell entwickelter Algorithmus von Qiagen verwendet (Huesken *et al.*, 2005). Einen Tag vor der Transfektion wurden die jeweiligen Zellen in 12-Kalotten-Platten ausgesät. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion betrug etwa 70%. Alle verwendeten siRNAs wurden von Qiagen hergestellt und nach Angaben des Herstellers mit dem QIAGEN RNAiFect

Transfection Kit transfiziert. Für die Transfektion wurde 130 nM siRNA in EC-R Puffer aufgenommen und mit 6 µl RNAiFect gemischt. Zur Bildung der Liposomen-RNA Komplexe wurde die Transfektionslösung 15 Min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 600 µl Wachstumsmedium überschichtet, worauf anschließend die Transfektionslösung getropft wurde. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Experimentbedingungen in neue 6-, 12- oder 24-Kalotten-Mikrotiterplatten umgesetzt und 72 h *p.t.* mit *C. trachomatis* infiziert.

## 2.12 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

### Zelllinie

HeLa Zervixepithel-Karzinom (human) ATCC: CCL-2

### Gebrauchsfertige Lösungen

RNeasy® 96 BioRobot® 8000 Kit QIAGEN

RNAiFectTransfection QIAGEN

Quantitect™ SYBR® Green RT-PCR Kit QIAGEN

### siRNA-Primer

**Tab. 2.11 Sequenzdaten der verwendeten Primer für die qRT-PCR siRNA-behandelter Zellen**

BEZEICHNUNG	SEQUENZ	HERSTELLER
CASP	vorwärts 5'-AAAGACCAGCCTGAAAGTCGG-3' rückwärts 5'-CCAGGGATGAGCTGAAAAAGT-3'	OPERON
GAPDH	vorwärts 5'-GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' rückwärts 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'	OPERON
Giantin	vorwärts 5'-CCCTAGACCCTGAATTACACCAA-3' rückwärts 5'-GGCAGAACAGTCCCTCCTTG-3'	OPERON
GM130	vorwärts 5'-AATATCAGCAGAGGAATAGCCCT-3' rückwärts 5'-CAGCATTTGTCCTTGGGTGTAT-3'	OPERON
Golgin-84	vorwärts 5'-AATGCACCACGACCAACCA-3', rückwärts 5'-AGGCAATTGGCCTTCTTGC-3'	OPERON
Gpp130	vorwärts 5'-CCCTCTCCGCCAGTTACA-3' rückwärts 5'-CTCCTCGTGTTGGCTTTTCA-3'	OPERON
p115	vorwärts 5'-AATTCTGGCTGGTCTGCACAG-3' rückwärts 5'-GCGCAAACAAATGGCTGC-3'	OPERON
p230	vorwärts 5'-ATGTATATGCAACAACCTGTGGGG-3' rückwärts 5'-CGAGGTGAAGTAAACATCAGCC-3'	OPERON
Rab1	vorwärts 5'-TCCCGGAACAGCCTATCTCAT-3' rückwärts 5'-TCCACACCAATTGTGCTGATG-3'	OPERON
Rab2	vorwärts 5'-TCATAATCGGCGACACAGGTG-3' rückwärts 5'-AGGATTCTTGCCCTGCCGTAT-3'	OPERON
Rab4	vorwärts 5'-GTCGCAGACGGCCATGTC-3' rückwärts 5'-TCGTACAGGACCTGAATCG-3'	OPERON
Rab5	vorwärts 5'-TGGTCAAGAACGATAACCATAG-3' rückwärts 5'-ATTGTCATCTGCATAGGACTG-3'	OPERON
Rab6	vorwärts 5'-CTCCTCTAGTTCCACAATGTC-3' rückwärts 5'-TATCCCACAGCTGAAGCCTG-3'	OPERON
Rab10	vorwärts 5'-TGCTTTTCAAGCTGCTCCTGA-3' rückwärts 5'-ATGATACCCATTGCGCCTCTG-3'	OPERON
Rab11	vorwärts 5'-ACGACGAGTACGACTACCTC-3' rückwärts 5'-TTCCATCAACCTGGATGCTTC-3'	OPERON
Rabkinesin-6	vorwärts 5'-CGTCAAGCCTTGACCACTTGT-3' rückwärts 5'-TTGAGCTTTGGCAGGTTGG-3'	OPERON



**Weiteres Material**

96-Kalotten-Mikrotiterplatte

TPP

**Methode**

Die Validierung der siRNA mittels qRT-PCR erfolgte nach (Machuy *et al.*, 2005). In drei unabhängigen Ansätzen wurden mit dem BioRobot® 8000 System 0,15 µg siRNA (Endkonzentration 115 nM) in Triplikaten mittels RNAiFect (1 µl) in 96-Kalotten-Mikrotiterplatten transfiziert. Die Zellzahl der HeLa-Zellen betrug 3000 pro Kalotte. 48 h später wurde die RNA mit dem RNeasy® 96 BioRobot® 8000 Kit isoliert und die relative mRNA-Menge *via* Quantitect™ SYBR® Green RT-PCR Kit nach Herstellerangaben und Primer, die die siRNA Bindungsseite flankierten, in der qRT-PCR bestimmt. Das relative Expressionslevel der mRNA wurde gegen Kontroll-transfizierte Zellen normalisiert. Als interner Standard wurde GAPDH verwendet. Die Probenaufarbeitung für die qRT-PCR wurde von den Mitarbeitern der abteilungsinternen RNAi-Gruppe durchgeführt.

**2.13 Herstellung stabil transduzierter Zelllinien****Zelllinien**

HeLa Zervixepithel-Karzinom (human) ATCC: CCL-2  
 293T embryonale Nierenzellen (human) ATCC: CRL-11268

**Wachstumsmedium**

RPMI GIBCO BRL  
 10% FKS, hitzeinaktiviert BIOCHROM

**shRNA****Tab.2.12 Sequenzdaten der verwendeten shRNAs**

BEZEICHNUNG	SEQUENZ	HERSTELLER
shRNA-Luciferase	5'-AACTTACGCTGAGTACTTCGA-3'	METABION
shRNA-Rab6	5'-TACGGTCTTCTTTGAGGTCAA-3'	METABION
shRNA-Rab11	5'-GGTTTCAGTATGTCTGAAGAG-3'	METABION

**Tab.2.13 Sequenzdaten der verwendeten Primer für die qRT-PCR shRNA-transduzierter Zellen**

BEZEICHNUNG	SEQUENZ	HERSTELLER
GAPDH	vorwärts 5'-GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' rückwärts 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'	OPERON
Rab6	vorwärts 5'-CTCCTCTAgTTCCACAATgTC-3' rückwärts 5'-TATCCCACAGCTGAAGCCTG-3'	OPERON
Rab11	vorwärts 5'-ACGACGAGTACGACTACCTC-3' rückwärts 5'-TTCCATCAACCTGGATGCTTC-3'	OPERON

**Tab.2.14 In dieser Arbeit hergestellte stabile Zelllinien (shRNA)**

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	STAMMSAMMLUNG
Luciferase-HeLa	pLVTHM-Vektor, EF1 $\alpha$ -Promotor, GFP-Kassette, H1-Promotor, Insertion von shRNA-Luciferase	DHE002
Rab6KD-HeLa	pLVTHM-Vektor, EF1 $\alpha$ -Promotor, GFP-Kassette, H1-Promotor, Insertion von shRNA-Rab6	DHE017
Rab11KD-HeLa	pLVTHM-Vektor, EF1 $\alpha$ -Promotor, GFP-Kassette, H1-Promotor, Insertion von shRNA-Rab11	ARL02
Leervektor-HeLa	pLVTHM-Vektor, EF1 $\alpha$ -Promotor, GFP-Kassette	pLVTHM

**Weiteres Material**

96-Kalotten-Mikrotiterplatte

TPP

**Methode**

RNAi kann in Säugetierzellen auch durch stabile Insertion lentiviral eingebrachter *short hairpin RNAs* (shRNA) ausgelöst werden. Dazu wurden mittels lentiviraler Vektorsysteme shRNA-Expressionskassetten stabil ins Zellgenom integriert (Wiznerowicz und Trono, 2003). Die Transfektions- und Infektionsrate konnte dabei über eine GFP-Kassette im Vektor pLVTHM kontrolliert werden. Das Design der shRNA erfolgte mit dem BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer von Invitrogen. Das Virus mit der jeweiligen shRNA wurde durch Calcium-Phosphat-Transfektion in Kombination mit den Verpackungsvektoren psPAX2 und pMD2G in 293T Zellen generiert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Transfektion betrug 20000 pro Mikrotiterkalotte. Das Virus im Überstand wurde nach 48 h abgenommen und zur Infektion von HeLa-Zellen in Anwesenheit von Polybrene (5  $\mu$ g/ml) eingesetzt. Sieben Tage nach Transduktion wurden GFP-exprimierende Zellen durchflusszytometrisch sortiert und

Einzelklone hergestellt. Für die Analyse der mRNA-Herunterregulation erfolgte die Virusinfektion auf 3500 HeLa-Zellen pro Mikrotiterkalotte in Anwesenheit von Polybrene (5 µg/ml). Fünf Tage nach Infektion wurde die mRNA mit dem RNeasy® 96 BioRobot® 8000 Kit in einem automatisierten Prozess isoliert und die relative mRNA-Menge *via* Quantitect™ SYBR® Green RT-PCR Kit nach Herstellerangaben und Primer, die die siRNA-Bindungsseite flankierten, in der qRT-PCR bestimmt. Als interner Standard wurde GAPDH verwendet und das relative Expressionslevel der mRNA wurde gegen Kontroll-transfizierte Zellen normalisiert. Die Infektion der lentiviralen Vektoren und die Validierung der Herunterregulation der mRNA wurden von den Mitarbeitern der abteilungsinternen shRNA-Gruppe durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen übergeben und die Effizienz des *knock down* in der Immunodetektion überprüft. Zellen, die mit dem lentiviralen Vektor ohne shRNA bzw. mit shRNA-Luciferase transduziert wurden, dienten als Kontrolle.

## 2.14 Bestimmung der Zellvitalität mittels des WST-1-Proliferationstest

<b>Gebrauchsfertige Lösungen</b>	
WST-1 Proliferation Kit	ROCHE
<b>Lösungen</b>	
20% Triton X-100	
PMA (Stocklösung: 100 mM)	
<b>Zelllinie</b>	
HeLa Zervixepithel-Karzinom (human)	ATCC: CCL-2
<b>Wachstumsmedium</b>	
RPMI	GIBCO BRL
10% FKS, hitzeinaktiviert	BIOCHROM
<b>Weiteres Material</b>	
96-Kalotten-Mikrotiterplatte	TPP

### Methode

Zur Bestimmung möglicher zytotoxischer Effekte von transfizierten siRNAs auf die Zellen wurde die Proliferation im WST-1 Test ermittelt. Die siRNA Transfektion erfolgte dazu in einer 96-Kalotten-Mikrotiterplatte in Triplikaten. 24 h *p.t.* wurden die transfizierten Zellen in eine neue 96-Kalotten-Platte umgesetzt und für weitere 24 h inkubiert. Als Proliferations-

Kontrolle wurde ein Triplikat 48 h *p.t.* mit dem Phorbol ester (Proliferationsstimulator) PMA (100 nM) behandelt; als Negativkontrolle wurde ein Triplikat mit 10 µl 20% TritonX-100 behandelt. 72 h *p.t.* wurden 10 µl WST-1-Reagenz und 40 µl Wachstumsmedium pro Kalotte zugegeben. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Photometer bei 450 nm.

## 2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration und Immunodetektion

### Gebrauchsfertige Lösungen und Materialien

BCA Protein Assay Reagent Kit	PIERCE
Complete Proteinaseinhibitor	ROCHE
Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Lösung	ROCHE
Röntgenfilme	KODAK

### Puffer für die Gelelektrophorese

Tab.2.15 verwendete Puffer für die Gelelektrophorese und den Immunoblot

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG
RIPA-Puffer	20 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 0,5% Triton X-100
Blockierungspuffer	3% Milchpulver in TBS
10x SDS-Elektrophoresepuffer	1,92 M Glycin, 250 mM TRIS, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer für SDS-Gelelektrophorese	1 M TRIS pH 6,8
Stripping Puffer	62,5 mM TRIS/HCl pH 6,7, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS
Transferpuffer	6 g TRIS, 28,8 g Glycin, 2 g SDS, 20% MeOH, ad 2 l H <sub>2</sub> O
10xTBS	20 mM TRIS pH 7,5, 140 mM NaCl Für TBST Zugabe von 0,05% Tween 20
Trenngelpuffer für SDS-Gelelektrophorese	1 M TRIS pH 9,0

### Weiteres Material

96-Kalotten-Mikrotiterplatte	TPP
------------------------------	-----

**Antikörper****Tab.2.16 Primärantikörper für den Immunoblot**

ANTIKÖRPER	SPEZIES	HERSTELLER
Aktin	Maus	SIGMA
Giantin	Kaninchen	CRP
GM130	Maus	BD
Golgin-84	Maus	BD
Gpp130	Kaninchen	CRP
Hsp60 (A57-E4)	Maus	ALEXIS
p230	Maus	BD
Rab4	Maus	TRANSDUCTION
Rab5	Kaninchen	SANTA CRUZ
Rab6	Kaninchen	CALBIOCHEM
Rab11	Maus	TRANSDUCTION
Tubulin	Maus	SIGMA

**Tab.2.17 Sekundärantikörper für den Immunoblot**

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	SPEZIES	HERSTELLER
IgG, Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert	Maus	Schaf	AMERSHAM
IgG, Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert	Kaninchen	Esel	AMERSHAM

**Methode**

Zur Herstellung eines Proteinlysats wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l RIPA-Puffer mit Proteinaseinhibitoren-Mischung (Complete, Roche) für 30 Min. auf Eis lysiert. Das Lysat wurde dann bei 13000 UpM und 4°C für 30 Min. zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit nach Angaben des Herstellers.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden denaturierende Polyacrylamid-Gele zwischen 4% und 15% verwendet, auf die 15-20  $\mu$ g Proteinlysat aufgetragen wurden (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe des Nassblotverfahrens auf eine PVDF Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde mit 3% Milchpulver in TBST blockiert und für eine weitere Stunde unter Schwenken mit dem

primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, gefolgt von wiederholtem Waschen. Mittels der *enhanced chemoluminescence* (ECL)-Lösung wurden die Antikörper auf einem Röntgenfilm detektiert.

## 2.16 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

### Lösungen

**Tab.2.18 verwendete Lösungen für die Immunfluoreszenz**

LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H <sub>2</sub> O, über Nacht quellen lassen, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5 unter Rühren auf 60°C erhitzen, danach Lösung bei 4000 UpM zentrifugieren
4% Paraformaldehyd (PFA)	8 g PFA, 20 ml 10x PBS, 8 g Saccharose, ad 200 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
10x PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 2,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Permeabilisierungspuffer	0,2% BSA in PBS, 0,2% Triton X-100

### Antikörper

**Tab.2.19 Primärantikörper für die Immunfluoreszenz**

ANTIKÖRPER	ORGANISMUS	HERSTELLER
Giantin	Kaninchen	CRP
GM130	Maus	BD
Golgin-84	Maus	BD
Gpp130	Kaninchen	CRP
Hsp60 (A57-E4)	Maus	ALEXIS
LPS	Kaninchen	MILAN ANALYTIKA
p230	Maus	BD

**Tab.2.20 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz**

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	SPEZIES	HERSTELLER
Fluoreszierende sekundäre Cy-Antikörper, Cy2-, Cy3- oder Cy5-konjugiert	Maus	Ziege	MOLECULAR PROBES
Fluoreszierende sekundäre Cy-Antikörper, Cy2-, Cy3- oder Cy5-konjugiert	Kaninchen	Ziege	MOLECULAR PROBES
<b>Weiteres Material</b>			
12-Kalotten-Mikrotiterplatten	TPP		
Deckgläschen	Marienfeld		
Objektträger			

### Methode

Für die Untersuchung mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden Zellen auf Glasplättchen ausgesät und je nach Versuchsaufbau mit *C. trachomatis* infiziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden diese Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 30 Min. mit 2% PFA fixiert. Anschließend erfolgte für 30 Min. die Permeabilisierung mit dem angegebenen Permeabilisierungspuffer. Für die Färbung wurde der spezifische Antikörper in einer PBS/0,2% BSA Lösung verdünnt und 20 µl auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellen-bewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen wieder zurück in die Mikrotiterplatte überführt und dreimal für 10 Min. mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte wie für den Erstantikörper beschrieben, allerdings unter Lichtausschluss. Nachfolgend wurden die Proben mit Mowiol auf einem Objektträger eingedeckt. Die Aufnahme der Zellen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP-1. Die erhaltenen Bilder wurden anschließend mit Adobe Photoshop 11.0 bearbeitet.

## 2.17 Lebendzellmikroskopie

### Zelllinien

Luciferase-HeLa  
Rab6KD-HeLa  
Rab11KD-HeLa

hergestellt in dieser Arbeit  
hergestellt in dieser Arbeit  
hergestellt in dieser Arbeit

### Bakterienstämme

*Chlamydia trachomatis* L2

lymphatisches Isolat ATCC: VR-902B

### Infektionsmedium

RPMI  
5% FKS, hitzeinaktiviert

GIBCO BRL  
BIOCHROM

### Fluoreszenz markiertes Ceramid

BODIPY-FL Ceramid  
(komplexiert an BSA)

MOLECULAR PROBES

### Weiteres Material

Glasbodenkulturschalen 3,5 cm

IBIDI

## Methode

Die Zellen wurden in 3,5 cm Glasbodenkulturschalen ausgesät und mit der jeweils angegebenen MOI mit *C. trachomatis* infiziert. Zur Untersuchung des Sphingolipid/Ceramid Transportes in Echtzeit wurden 300 nM BODIPY-FL Ceramid-Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Visualisierung erfolgte an einem Leica TCS SP-5 Mikroskop. Über einen Zeitraum von 30 Min. wurden unter identischen Bedingungen alle 30 Sek. Z-Stapelbilder aufgenommen. Der Abstand der optischen Schnitte der Bilder betrug jeweils 1 µm. Insgesamt wurden 7 Stapel aufgenommen.



## 2.18 Transmissionselektronenmikroskopie

### Zelllinien

Luciferase-HeLa

hergestellt in dieser Arbeit

Rab6KD-HeLa

hergestellt in dieser Arbeit

Rab11KD-HeLa

hergestellt in dieser Arbeit

### Bakterienstämme

*Chlamydia trachomatis* L2

lymphatisches Isolat ATCC: VR-902B

### Infektionsmedium

RPMI

GIBCO BRL

5% FKS, hitzeinaktiviert

BIOCHROM

### Lösungen

**Tab.2.21** verwendete Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie

LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
10x PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 2,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O
2,5% Glutaraldehyd	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H <sub>2</sub> O, über Nacht quellen lassen, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8,5 unter Rühren auf 60°C erhitzen, danach Lösung bei 4000 UpM zentrifugieren
0,5% Osmiumtetroxid	gebrauchsfertig
2% Uranylacetat	gebrauchsfertig
0,1% Tanninsäure	gebrauchsfertig
Epoxidharz PolyBed	gebrauchsfertig (POLYSCIENCE)

### Weiteres Material

6-Kalotten-Mikrotiterplatten

TPP

### Methode

Zur ultrastrukturellen Analyse der chlamydialen Formen in der Inklusion wurden die stabil transduzierten Zelllinien in 6-Kalotten-Mikrotiterplatten ausgesät und mit *C. trachomatis* für 24 h und 42 h infiziert (MOI 1). Zur Probenaufbereitung wurden die infizierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Danach wurden die Ansätze mit 0,5% Osmiumtetroxid inkubiert und mit 0,1% Tanninsäure und 2% Uranylacetat kontrastiert.

Abschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Epoxidharz eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem Leo 906E Transmissions-elektronenmikroskop. Die Bilder wurden mit einer Morada-Digitalkamera aufgenommen.

Die Probenaufarbeitung und die Aufnahme der Bilder am Transmissions-elektronenmikroskop wurden von den Mitarbeitern der Core Facility Mikroskopie durchgeführt.

## **2.19 Statistische Datenanalyse**

Im Allgemeinen zeigen die dargestellten Diagramme die Daten aus drei unabhängigen Untersuchungen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student'schen t-Tests zweiseitig ermittelt und ist durch \* gekennzeichnet (\*  $p$ -Wert<0,05; \*\*  $p$ -Wert<0,01).

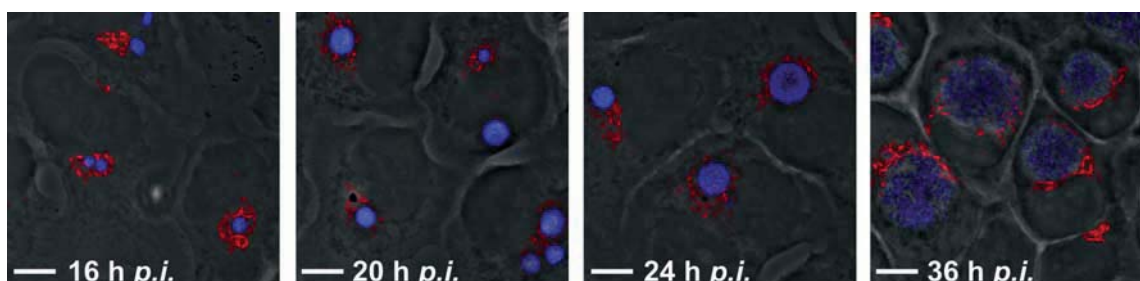
### III. ERGEBNISSE

#### 3.1 Struktur des Golgi-Apparates während der Infektion mit *C. trachomatis*

In der Arbeitsgruppe konnte bereits demonstriert werden, dass Chlamydien mit dem Golgi-Apparat in Wechselwirkung treten. Eine Infektion führte zur Auflösung der Struktur des typischen Golgi-Bandes. Diese Fragmentierung ging mit einer Spaltung des Golgi-Strukturproteins Golgin-84 einher. Die Chlamydien-Infektion führte zur Prozessierung von Golgin-84 in zwei Fragmente: Einem ca. 78 kDa und einem ca. 65 kDa großen Spaltprodukt (Heuer *et al.*, 2008). Die Spaltfragmente waren ab 16 h nach Infektion im Immunoblot sichtbar. Anhand von Immunfluoreszenzanalysen sollte untersucht werden, ob der Zeitpunkt der Fragmentierung des Golgi-Apparates mit der Spaltung von Golgin-84 korrelierte.

Der Golgi-Komplex besteht aus einer Anordnung von bis zu 100 dicht gepackten Membranstapeln, den sogenannten Zisternen, die über tubuläre Verbindungen die charakteristische Bänderstruktur des Golgi-Apparates ausbilden. Dabei unterscheidet man den cis-Golgi, den medial-Golgi und das trans-Golgi-Netzwerk (TGN), welche durch spezifische Marker analysiert werden können.

In Abb. 3.1 ist deutlich erkennbar, dass es im Zuge einer *C. trachomatis*-Infektion zu einer auffälligen Streuung des cis-Golgi-Proteins GM130 innerhalb der Zelle kam. Diese Verteilung ist bereits 16 h nach Infektion sichtbar und nimmt im weiteren Verlauf zu.



**Abb. 3.1 Infektion mit *C. trachomatis* führt zur Fragmentierung des Golgi-Apparates in HeLa-Zellen**

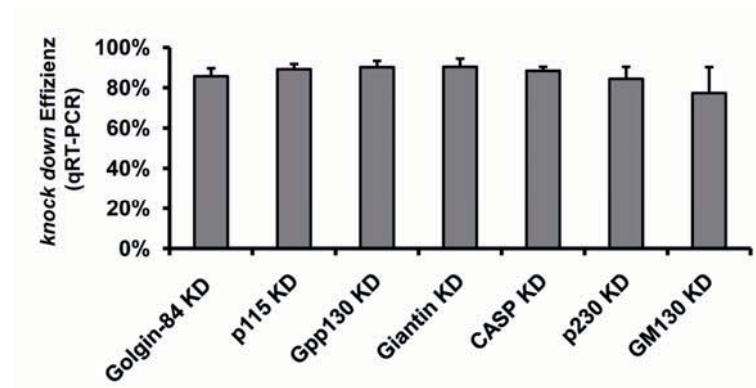
HeLa-Zellen wurden für die jeweils angegebene Dauer mit *C. trachomatis* infiziert (MOI 1). Für die Immunfluoreszenz wurden das cis-Golgi-Protein GM130 (roter Kanal) und chlamydiales LPS (blauer Kanal) mittels spezifischer Antikörper angefärbt und in einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop visualisiert. Dargestellt ist die Überlagerung des roten und blauen Kanals mit dem Phasenkontrast. Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

## 3.2 Einfluss von Golgi-Proteinen auf die Vermehrung von Chlamydien

### 3.2.1 Validierung des siRNA-vermittelten Verlustes von Golginen

Die vorherige Untersuchung in Chlamydien-infizierten Zellen zeigte, dass es während der Infektion zu einem Aufbrechen der Golgi-Struktur kam. Um die Bedeutung der Fragmentierung auf die chlamydiale Entwicklung zu untersuchen, wurden RNAi-Analysen durchgeführt. Dazu wurden spezifische siRNAs erzeugt, die sich gegen ausgewählte Strukturproteine des Golgi-Apparates richteten. Das Design erfolgte mit einem speziellen Algorithmus von Qiagen (Huesken *et al.*, 2005). Eine siRNA gegen Luciferase wurde als Kontrolle verwendet. Humane Zellen besitzen kein Luciferase-Gen; somit ist die siRNA gegen Luciferase funktionslos. Die Transfektion wurde mit Hilfe des RNAiFect-Transfektionsreagenz in HeLa-Zellen durchgeführt, aus denen drei Tage *p.t.* mRNA für die Überprüfung der siRNA-vermittelten Reduktion der mRNA-Menge isoliert wurde. Die Validierung der Herabregulation auf mRNA-Ebene erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR). Abb. 3.2 zeigt, dass alle verwendeten siRNAs einen *knock down* von mindestens 70% in HeLa-Zellen erzeugten.

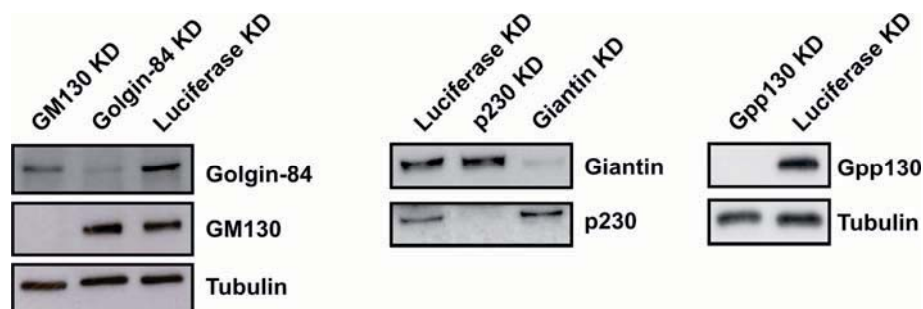
Das Einbringen von RNA-Oligonukleotiden in die Zelle kann allerdings die Interferon-Antwort induzieren und zur Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) und Oligoadenylat-Synthetase (OAS) führen. Dadurch wird die Proteinsynthese gestoppt und es kommt zu unspezifischer Degradation von mRNA. Um eine transfektionsbedingte Induktion der Interferonantwort auszuschließen, wurde eine PCR-Amplifikation der aktivierten OAS und der PKR durch die abteilungsinterne RNAi-Gruppe durchgeführt. Keine der in dieser Arbeit benutzten siRNAs aktivierte das Interferonsystem in den verwendeten Zellen.



**Abb. 3.2 Validierung der verwendeten siRNA gegen Golgi-Strukturproteine mittels qRT-PCR**

HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen die angegebenen Zielgene transfiziert. 48 h *p.t.* wurde mRNA isoliert und mittels spezifischer Primer eine qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die siRNA-vermittelte *knock down* (KD) Effizienz in Prozent + Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

In weiterer Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen der qRT-PCR konnte der siRNA-vermittelte *knock down* von Zielproteinen ebenfalls im Immunoblot gezeigt werden (Abb. 3.3). Der Proteingehalt von Golgin-84, GM130, Giantin, p230 und Gpp130 nach siRNA-Behandlung war stark reduziert bis hin zu nicht nachweisbar. Für die anderen Proteine lagen keine spezifischen Antikörper zur Immunodetektion vor.

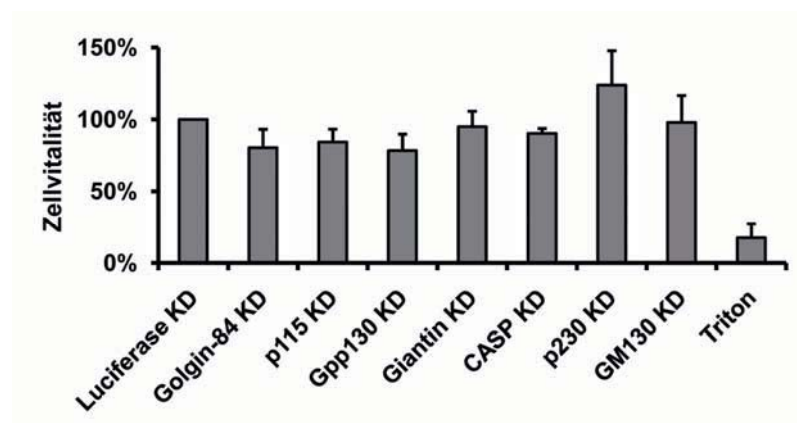


**Abb. 3.3 Validierung der verwendeten siRNAs gegen Golgi-Proteine im Immunoblot**

Lysate von siRNA-behandelten Zellen wurden drei Tage *p.t.* in der Immunodetektion über spezifische Antikörper auf ihre *knock down* (KD) Effizienz untersucht. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle.

### 3.2.2 Untersuchung zytotoxischer Effekte nach siRNA-Behandlung gegen Golgi-Proteine

Sowohl die Transfektionsbedingungen, als auch die Herunterregulation spezifischer Zielproteine können sich unter Umständen zellschädigend auswirken. Untersuchungen, wie z.B. die chlamydiale Vermehrung, könnten in diesem Fall nicht ausgeführt werden oder wären stark beeinträchtigt, da Chlamydien auf ihre Wirtszelle angewiesen sind. Deshalb wurden alle generierten siRNAs vor Verwendung in weiterführenden Experimenten zusätzlich auf mögliche zytotoxische Effekte, gemessen anhand der metabolischen Aktivität der Zellen, mittels des WST-1 Tests untersucht. Dieser kolorimetrische, nicht-radioaktive Test basiert auf der Spaltung eines Tetrazolium-Salzes in Formazan durch zelluläre  $\text{NAD}^+$ -Hydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen. Zur Kontrolle wurden einige Zellen mit zellschädigendem Triton X-100 behandelt. Die Ergebnisse des WST-1 Tests zeigten, dass unter diesen Bedingungen keine zytotoxischen Auswirkungen beobachtet werden konnten und diese siRNAs in weiteren Studien verwendet werden können (Abb. 3.4).



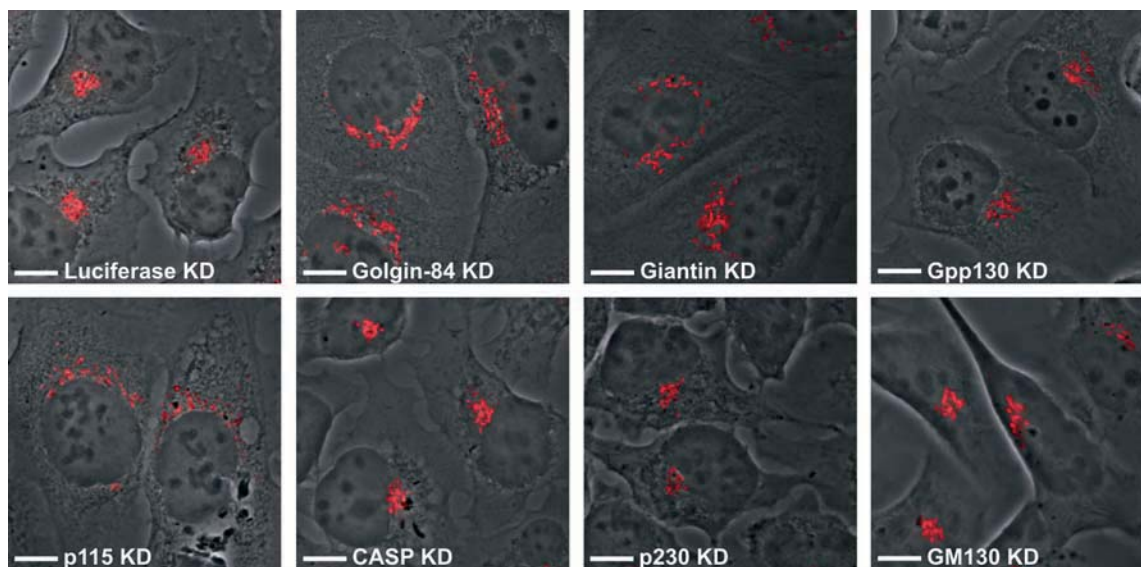
**Abb. 3.4 Zellvitalität nach Herunterregulation der Expression von Golgi-Proteinen mittels RNAi in HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA behandelt. 72 h *p.t.* wurde die Proliferation der Zellen mit Hilfe des WST-1 Tests bestimmt. Als Negativkontrolle dienten mit Triton X-100 behandelte Zellen. Der Wert der Luciferase-behandelten Probe wurde auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Zellvitalität in Prozent aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten in Triplikaten + Standardabweichung. KD, *knock down*

### 3.2.3 Struktur des Golgi-Apparates in siRNA-behandelten Zellen

Eine Immunfluoreszenzfärbung sollte Aufschluss über die morphologische Erscheinung des Golgi-Apparates in siRNA-behandelten nicht-infizierten und *C. trachomatis*-infizierten Zellen geben. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die cis-Golgi-Proteine GM130 und Giantin angefärbt. Die Auswertung mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop ergab, dass der *knock down* von Golgin-84, Giantin, p115, und Gpp130 eine starke Fragmentierung des Golgi-Apparates in nicht-infizierten Zellen induzierte (Abb. 3.5). In CASP-, GM130- und p230-*knock down* Zellen war kein Unterschied zu der Golgi-Struktur der Luciferase-Kontrollzellen festzustellen.

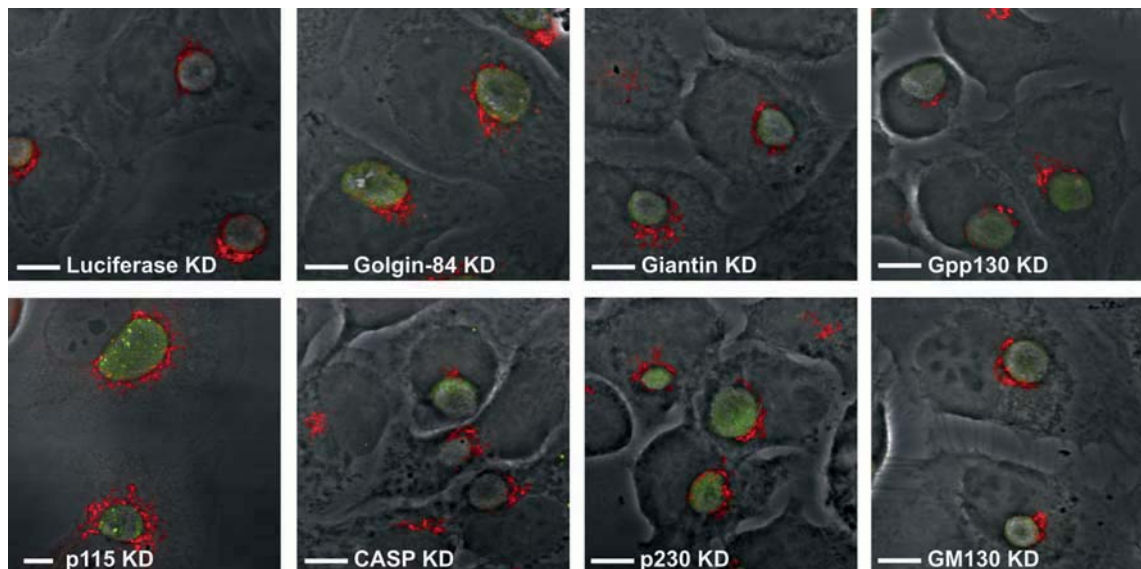
In *C. trachomatis*-infizierten Zellen zeigte sich unter Verlust von Golgin-84, Giantin, p115, und Gpp130 eine vesikuläre Struktur von Golgi-Elementen, die um die Inklusion lokalisiert waren. Die morphologische Erscheinung des Golgi-Apparates in CASP-, GM130- und p230-herunterregulierten Zellen hingegen entsprach dem Phänotyp der Kontrolle (Abb. 3.6).



**Abb. 3.5 Golgi-Fragmentierung in Golgi-Protein-*knock down* (KD) Zellen**

siRNA-transfizierte Zellen wurden vier Tage *p.t.* zur Untersuchung der Golgi-Struktur in der Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen das cis-Golgi-Protein GM130 (roter Kanal) angefärbt und an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop visualisiert. In GM130-siRNA-behandelten Zellen wurde spezifisch das cis-Golgi-Protein Giantin nachgewiesen. Dargestellt ist die Überlagerung mit dem Phasenkontrast. Messbalken entsprechen 10 µm.





**Abb. 3.6 Golgi-Fragmentierung in *C. trachomatis*-infizierten Golgi-Protein-*knock down* (KD) Zellen**

siRNA-transfizierte Zellen wurden drei Tage *p.t.* für 24 h mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert und anschließend für die Immunfluoreszenz angefärbt. Cis-Golgi-Strukturen wurden mittels des spezifischen Antikörpers GM130 (roter Kanal) und die Inklusionen mit einem Antikörper gegen chlamydiales LPS (grüner Kanal) detektiert und an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop visualisiert. In GM130-siRNA-behandelten Zellen wurde spezifisch das cis-Golgi-Protein Giantin nachgewiesen. Dargestellt ist die Überlagerung mit dem Phasenkontrast. Messbalken entsprechen 10 µm.

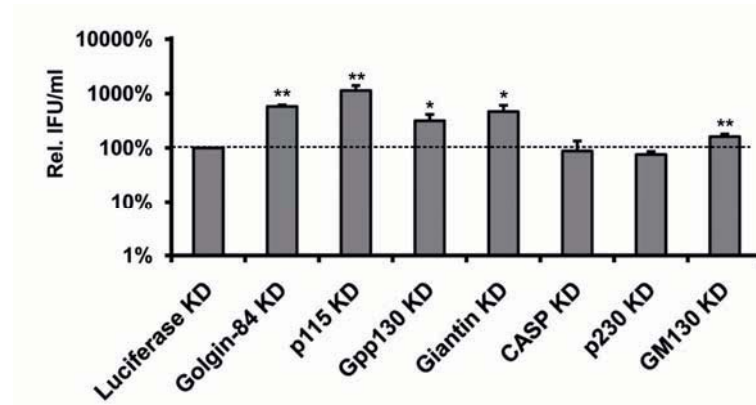
### 3.2.4 Auswirkungen der Golgi-Fragmentierung auf die chlamydiale Entwicklung

Eine Fragmentierung des Golgi-Apparates kann durch Herunterregulation der Zielgene Golgin-84, p115, Giantin oder Gpp130 ausgelöst werden. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob diese siRNA-vermittelte Golgi-Fragmentierung einen Einfluss auf die bakterielle Infektivität hatte. Zur Bestimmung der Infektivität (Anzahl infektiöser Nachkommen) wurden die *C. trachomatis*-infizierten Zellen nach 48 h mit Glaskugeln lysiert und die freigesetzten EK in einer seriellen Verdünnungsreihe auf frischen HeLa-Zellen titriert. Die Behandlung der Zellen mit Luciferase-siRNA wurde als Kontrolle verwendet und die Infektivität dieser Probe auf 100% gesetzt.

Der *knock down* von CASP und p230 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl infektiöser Nachkommen (Abb. 3.7). Die Herunterregulation von GM130 hatte eine leichte, aber signifikante Steigerung der Infektivität auf 161% zur Folge. Im Gegensatz dazu führte die Herunterregulation der Proteine Golgin-84, p115, Gpp130, und Giantin signifikant zu einer



mindestens vierfachen Erhöhung der Infektivität. Daraus lässt sich schließen, dass die vorzeitige Golgi-Fragmentierung durch siRNA-Behandlung von Vorteil für die chlamydiale Entwicklung ist.



**Abb. 3.7 Einfluss der Herunterregulation von Golginen auf die Anzahl infektiöser Nachkommen**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und mit *C. trachomatis* (MOI 3) für 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Anzahl infektiöser Nachkommen durch Titration auf neue HeLa-Zellen bestimmt. Die Anzahl infektiöser Bakterien in Luciferase-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung der relativen IFU/ml in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p$ -Wert < 0,05, \*\*  $p$ -Wert < 0,01. KD, knock down

### 3.3 Die Rolle von Rab-Proteinen in der Chlamydien-Infektion

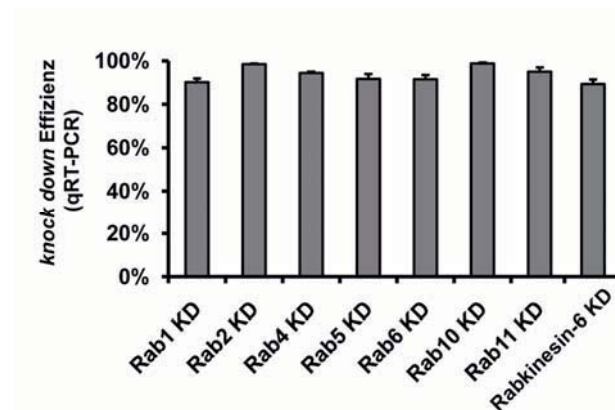
#### 3.3.1 Validierung des Verlustes von Rab-Proteinen mittels RNAi

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, hatte sowohl die Infektion mit Chlamydien, als auch der Verlust von Golgi-Strukturproteinen mittels RNAi die Auflösung des Golgi-Apparates zur Folge. Dabei akkumulierten vesikuläre Strukturen im Zytoplasma nicht-infizierter Zellen und an der Inklusionsmembran in infizierten Zellen. Der intrazelluläre Transport von Vesikeln unterliegt der Regulation von Rab-Proteinen. Diese könnten für die Rekrutierung Golgi-abgeleiteter Vesikel an die Inklusion verantwortlich sein.

Mittels RNAi sollte die Bedeutung von Rab-Proteinen während einer Chlamydien-Infektion untersucht werden. Die Effizienz des *knock down* auf mRNA-Ebene erfolgte mittels qRT-PCR. In Abb. 3.8 ist die Verminderung der spezifischen mRNA in Prozent nach siRNA-Behandlung dargestellt. Damit die hergestellte siRNA in nachfolgende Untersuchungen einbezogen werden konnte, sollte die Reduktion der mRNA mindestens 70% betragen. Die Validierung ergab, dass alle verwendeten siRNAs eine mehr als 80%ige Reduktion der spezifischen mRNA vermittelten. Eine Aktivierung der zellulären Interferonantwort nach siRNA-Behandlung

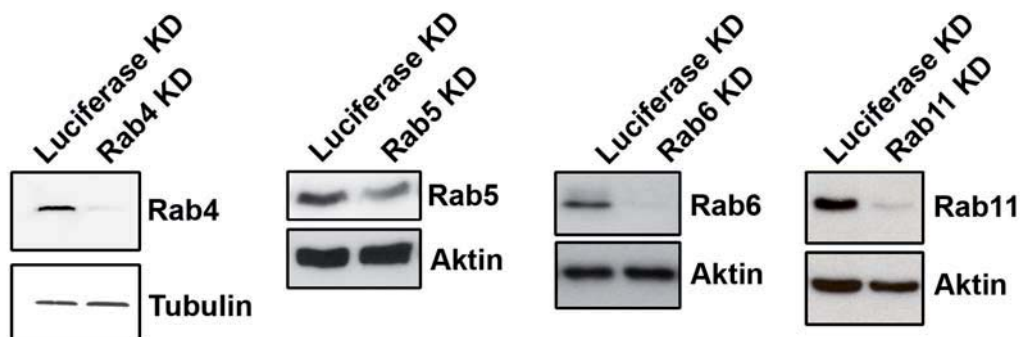
gegen Rab-Proteine konnte, wie bereits im Abschnitt 3.2.1 beschrieben, durch die abteilungsinterne RNAi-Gruppe ausgeschlossen werden. Keine der in dieser Arbeit benutzten siRNAs gegen Rab-Proteine aktivierte das Interferonsystem der Zelle.

Die Analyse einiger ausgewählter Lysate im Immunoblot gab Aufschluss über die Reduktion der Proteinexpression nach siRNA-Behandlung (Abb. 3.9). 72 h *p.t.* wurden Rab4, Rab6 und Rab11 im Zelllysat nicht mehr detektiert, und auch die Rab5-Proteinmenge war deutlich verringert. Für die anderen Proteine lagen keine spezifischen Antikörper zur Immunodetektion vor. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die generierten siRNAs zu einem effektiven Verlust spezifischer Rab-Proteine in der Wirtszelle führten.



**Abb. 3.8 Validierung der verwendeten siRNAs gegen Rab-Proteine mittels qRT-PCR**

HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen die angegebenen Zielgene transfiziert. 48 h später wurde mRNA isoliert und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Dargestellt ist die siRNA-vermittelte *knock down* (KD) Effizienz in Prozent + Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

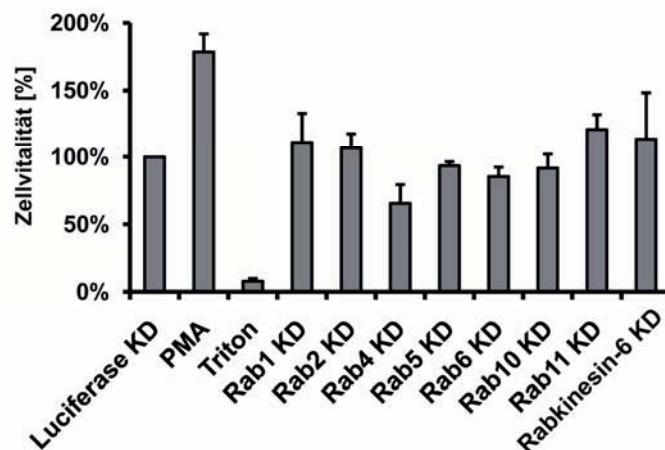


**Abb. 3.9 Validierung der verwendeten siRNAs gegen Rab-Proteine im Immunoblot**

Lysate von siRNA-behandelten Zellen wurden im Immunoblot mittels spezifischer Rab Antikörper auf die *knock down* (KD) Effizienz untersucht. Der Nachweis von Aktin oder Tubulin diente als Ladekontrolle.

### 3.3.2 Untersuchung zytotoxischer Effekte nach siRNA-Behandlung gegen Rab-Proteine

Um mögliche zytotoxische Effekte der Versuchsbedingungen und des *knock down* auf die Zellen in nachfolgenden Experimenten auszuschließen, wurde, wie bereits im Abschnitt 3.2 erläutert, die Zellvitalität nach siRNA-Behandlung im WST-1 Test ermittelt. Als Kontrolle wurden einige Zellen zum einen mit dem Phorbol-ester PMA (Phorbol-12- Myristat-13-Acetat) zur Proliferation stimuliert oder zum anderen mit zellschädigendem Triton X-100 behandelt. Abb. 3.10 zeigt, dass keine der verwendeten siRNAs einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität ausübte. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte im *knock down* von Rab4 keine auffälligen toxischen Effekte.



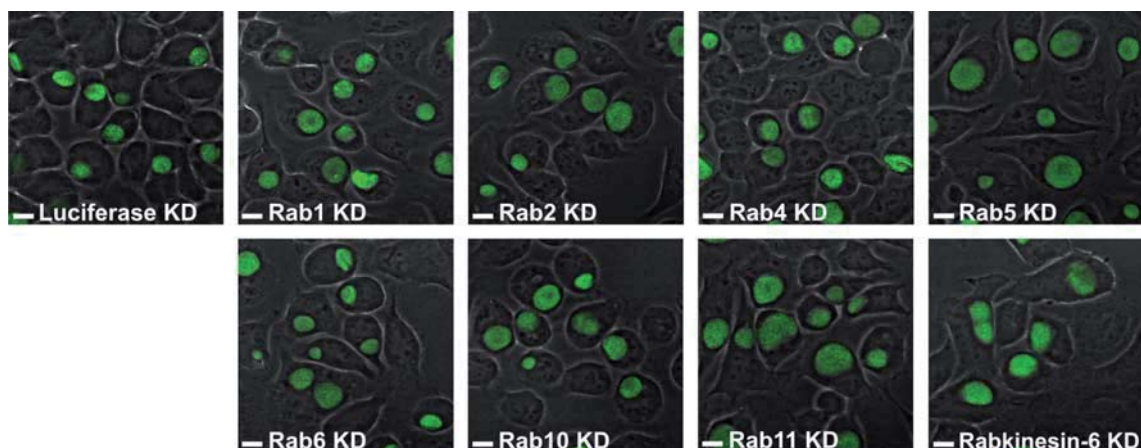
**Abb. 3.10 Zellvitalität nach siRNA-Behandlung gegen Rab-Proteine in HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA behandelt. 72 h *p.t.* wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe des WST-1 Tests bestimmt. Als Negativkontrolle dienten mit Triton X-100 behandelte Zellen, während die Behandlung der Zellen mit PMA die Positivkontrolle darstellt. Der Wert der Luciferase-behandelten Probe wurde auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Zellvitalität in Prozent aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten in Triplikaten + Standardabweichung. KD, *knock down*

### 3.3.3 Auswirkungen des *knock down* von Rab-Proteinen auf die primäre Infektion und die bakterielle Infektivität

Nachdem demonstriert werden konnte, dass alle hergestellten siRNAs die Zielgen-Expression sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene herunterregulierten, wurde anschließend

geprüft, welche Auswirkungen der Verlust dieser Proteine auf die chlamydiale Vermehrung hatte. Für diese Untersuchung wurden HeLa-Zellen mit je 130 nM der angegebenen siRNA transfiziert und 72 h *p.t.* mit *C. trachomatis* infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen chlamydiales Hsp60 für Immunfluoreszenzanalysen angefärbt, um Aussagen über mögliche Unterschiede in der primären Infektion nach siRNA-Behandlung zu erhalten, wie z.B. Unterschiede in der Anzahl gebildeter Inklusionen durch eine schlechtere Aufnahme der infektiösen Partikel. Die konfokalen Aufnahmen in Abb. 3.11 zeigen siRNA-behandelte Zellen, die für 24 h mit *C. trachomatis* infiziert wurden. Dabei wird deutlich, dass der Verlust einzelner Rab-Proteine keine Auswirkung auf die primäre Infektion besitzt. Die Inklusionen in Rab5- und Rab11-herunterregulierten Zellen erscheinen vergrößert, allerdings hatte dies keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl an gebildeten Inklusionen.

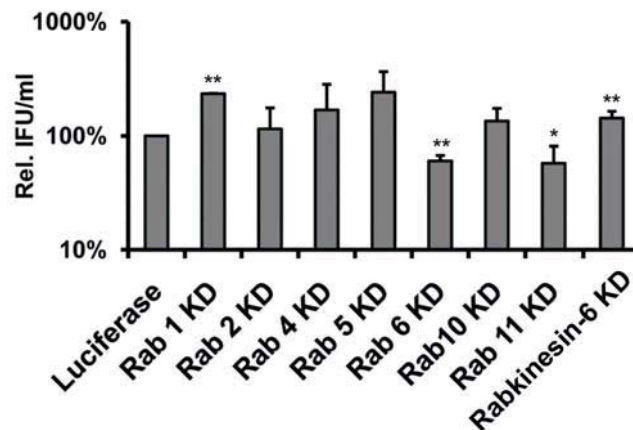


**Abb. 3.11 *C. trachomatis*-Infektion in Rab-Protein-knock down (KD) Zellen**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und anschließend mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert. 24 h *p.i.* erfolgte der Nachweis chlamydialen Hsp60 Proteins durch Verwendung spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz (grüner Kanal). Die Aufnahme der Bilder erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Dargestellt ist die Überlagerung mit dem Phasenkontrast. Messbalken entsprechen 10µm.

Im Gegensatz zu den Primärinfektionen zeigte die Analyse der Infektivitäten nach funktionellem Ausfall von Rab-Proteinen signifikante Unterschiede (Abb. 3.12). Die Behandlung der Zellen mit Luciferase-siRNA wurde als Kontrolle verwendet und die Infektivität dieser Probe auf 100% gesetzt. Der *knock down* von Rab1 und Rabkinesin-6 hatte eine mehr als doppelte Erhöhung der Infektivität zur Folge, während die Herunterregulation von Rab6 und Rab11 die Infektivität signifikant reduzierten (60% bei Rab6, 57% bei Rab11).

Alle weiteren untersuchten siRNAs hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Infektivität der Chlamydien. Dies bedeutet, dass nach *knock down* von Rab6 oder Rab11 die Vermehrung inhibiert wird, wohingegen der *knock down* von Rab1 und Rabkinesin-6 die Vermehrung positiv beeinflusst, ohne dass signifikante Unterschiede in der Primärinfektion zu beobachten sind.



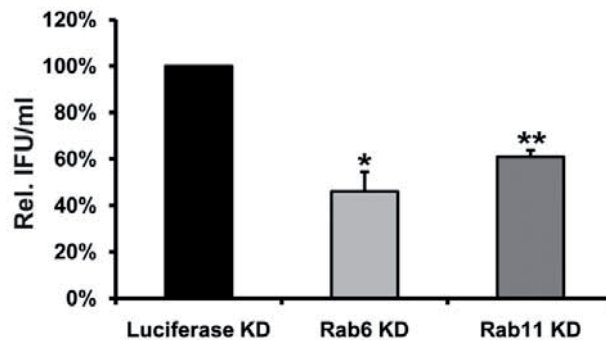
**Abb. 3.12 Knock down (KD) von Rab-Proteinen hat unterschiedliche Auswirkungen auf die bakterielle Infektivität**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und mit *C. trachomatis* (MOI 3) für 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Anzahl infektiöser Nachkommen durch Titration auf neue HeLa-Zellen bestimmt. Luciferase-siRNA-behandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung der relativen IFU/ml in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten. \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01.

### 3.3.4 Herunterregulation von Rab-Proteinen mittels RNAi in anderen Zelllinien

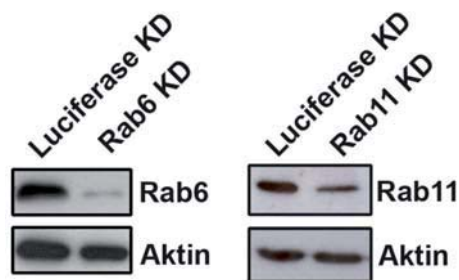
Ist die niedrigere Infektivität der Chlamydien spezifisch für HeLa-Zellen, oder führt der Verlust von Rab6 und Rab11 auch in anderen Zelllinien zu einer verminderten Infektivität der Nachkommenschaft? Um diese Frage zu beantworten, wurden Rab6 und Rab11 mittels RNAi zusätzlich in der Larynxkarzinomzelllinie HEP-2 ausgeschaltet und anschließend mit *C. trachomatis* infiziert. Die Bestimmung der Infektivität zeigte, dass auch in diesen Zellen der Verlust von Rab11 zu einer Reduktion der bakteriellen Vermehrung führte (Abb. 3.13). Rab6-*knock down* reduzierte die chlamydiale Infektivität auf 46% in HEP-2-Zellen. Die Infektivität der Chlamydien unter Ausfall von Rab11 lag bei 61%. Immunoblotanalysen bestätigten die Reduktion der Menge des jeweiligen Rab-Proteins nach Transfektion der spezifischen siRNAs (Abb. 3.14).

Dies zeigt, dass sich die beobachteten Auswirkungen des Verlustes von Rab6 und Rab11 auf die Chlamydien in HeLa-Zellen auch generell auf andere Zelltypen übertragen lassen, und es sich nicht um einen HeLa-spezifischen Effekt handelt.



**Abb. 3.13 Infektivität nach Herunterregulation von Rab6 und Rab11 in der Zelllinie HEp-2**

HEp-2 Zellen wurden mit siRNAs gegen Rab6 und Rab11 behandelt und anschließend mit *C. trachomatis* (MOI 3) für 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Anzahl infektiöser Nachkommen durch Titration auf neue HEp-2-Zellen bestimmt. Luciferase-siRNA-behandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung der relativen IFU/ml in Prozent aus zwei unabhängigen Experimenten. \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01. KD, knock down



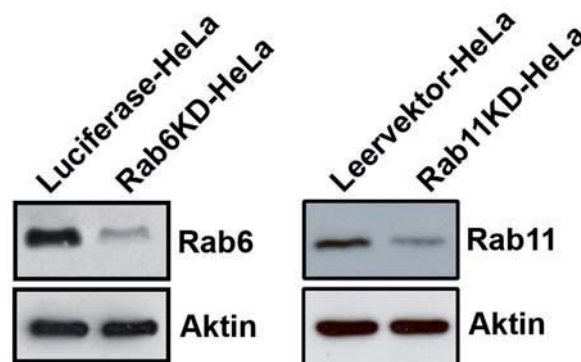
**Abb. 3.14 Immunoblotanalysen der Herunterregulation von Rab6 und Rab11 in der Zelllinie HEp-2**

Zelllysate aus siRNA-transfizierten HEp-2-Zellen wurden im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. KD, knock down

### 3.3.5 Herstellung stabiler Rab6- und Rab11-knock down Zellen

Für weiterführende Analysen wurden shRNAs (*short hairpin RNA*) gegen Rab11 und Rab6 generiert. Durch stabile Insertion in das zelluläre Genom lentiviral eingebrachter shRNAs wird eine permanente Expression der shRNA und somit eine kontinuierliche Suppression der Expression des Zielproteins erreicht. shRNAs produzieren einen Einzelstrang von 50-70 nt Länge, der eine Stamm-Schleifen-Struktur ausbildet. Diese Struktur wird durch die Enzyme DROSHA und DICER prozessiert und als siRNA in den Komplex RISC eingebaut.

Mittels einer GFP-Kassette im Vektor pLVTHM wurde durch Koexpression von GFP die Infektionsrate der generierten shRNAs kontrolliert (Wiznerowicz und Trono, 2003). Zellen, die mit dem lentiviralen Leervektor bzw. mit shRNA-Luciferase transduziert wurden, dienten als Kontrolle (Leervektor-HeLa und Luciferase-HeLa). Die Zelllinien mit der stabilen Rab-Protein shRNA-Insertion wurden als Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa bezeichnet. Immunoblotanalysen zeigten einen deutlichen Verlust der jeweiligen Zielproteine Rab6 und Rab11 in den hergestellten Zelllinien (Abb. 3.15).

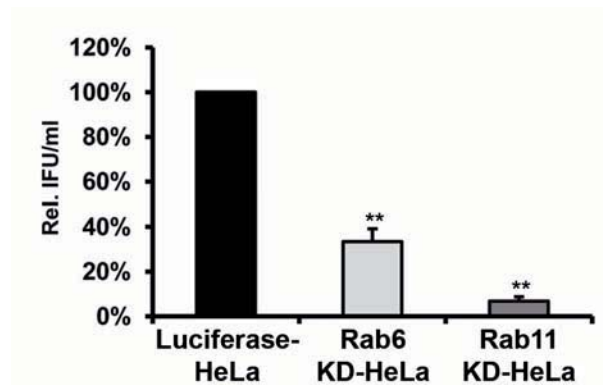


**Abb. 3.15** Immunoblotanalyse der Validierung der stabil transduzierten Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa

Zelllysate lentiviral stabil transduzierter Zelllinien wurden im Immunoblot auf die Effizienz des *knock down* untersucht. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern und der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Eine stabil transduzierte Zelllinie mit dem Leervektor und die Luciferase-HeLa-Zelllinie dienten als Kontrolle.

Als nächstes wurde die Infektivität in den stabilen *knock down* Zelllinien verifiziert. Entsprechend den vorangegangenen siRNA-Versuchen zur Infektivität wurden die shRNA-Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und 48 h *p.i.* auf neue HeLa-Zellen titriert (Abb. 3.16). Die Analyse der Infektivitäten in den stabilen *knock down* Zellen bestätigte die Daten aus den siRNA-vermittelten Versuchen. Die Expression der shRNAs führte ebenfalls zu einer Reduktion in der chlamydialen Vermehrung, mit einer Verminderung von 67% in Rab6KD-HeLa und 93% in Rab11KD-HeLa. Hier war die Vermehrungsrate sogar stärker gestört, als in den vergleichbaren siRNA-Experimenten.





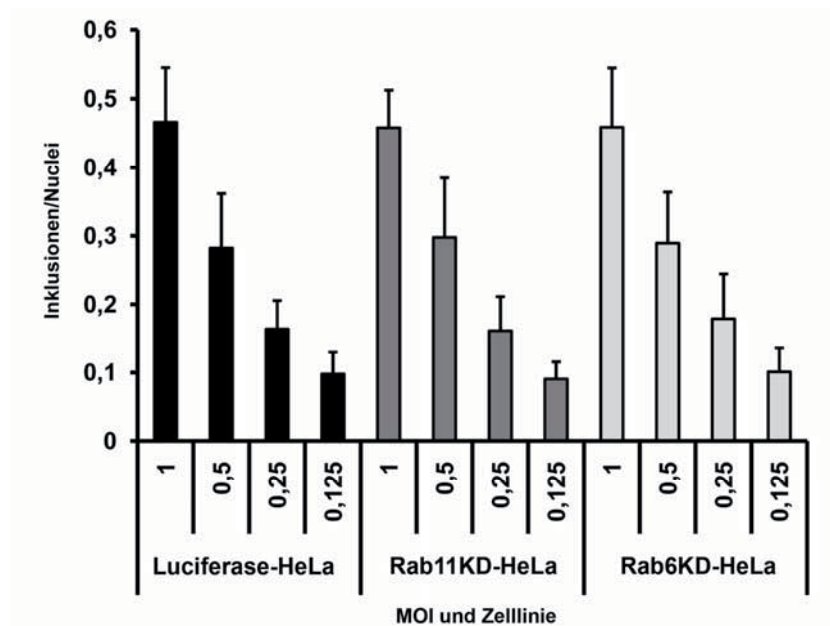
**Abb. 3.16** Infektivität in den hergestellten stabil transduzierten Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa

Stabil transduzierte Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI 3) für 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Anzahl infektiöser Nachkommen durch Titration auf frischen HeLa-Zellen bestimmt. Luciferase-Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung der relativen IFU/ml in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten. \*\*p- Wert<0,01

### 3.3.6 Untersuchung der Primärinfektion in shRNA-vermittelten *knock down* Zellen

Um zu untersuchen, ob es in den Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa zu Unterschieden in der primären Infektion kommt, wurden in Immunfluoreszenzanalysen die Anzahl der gebildeten Inklusionen im Verhältnis zur Zellzahl bestimmt. Dazu wurden *C. trachomatis*-infizierte Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa 24 h *p.i.* mit einem spezifischen Antikörper gegen chlamydiales MOMP angefärbt. Zusätzlich wurde die bakterielle und zelluläre DNA mit Hoechst gegengefärbt. Mittels automatisierter Mikroskopie (Scan<sup>R</sup>) und anschließender Softwareanalyse konnte die Anzahl der Inklusionen pro Zelle bestimmt werden. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die eine Integration der shRNA gegen Luciferase beinhalten. Abb. 3.17 zeigt deutlich, dass sich die Anzahl der ausgebildeten Inklusionen zur Anzahl der Zellen in den untersuchten Zelllinien nicht unterscheidet und somit ein Einfluss der Herunterregulation der Rab-Proteine auf die Anzahl der gebildeten Inklusionen, die primäre Infektion, ausgeschlossen werden konnte.





**Abb. 3.17 Vergleich der Primärinfektion in Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa**

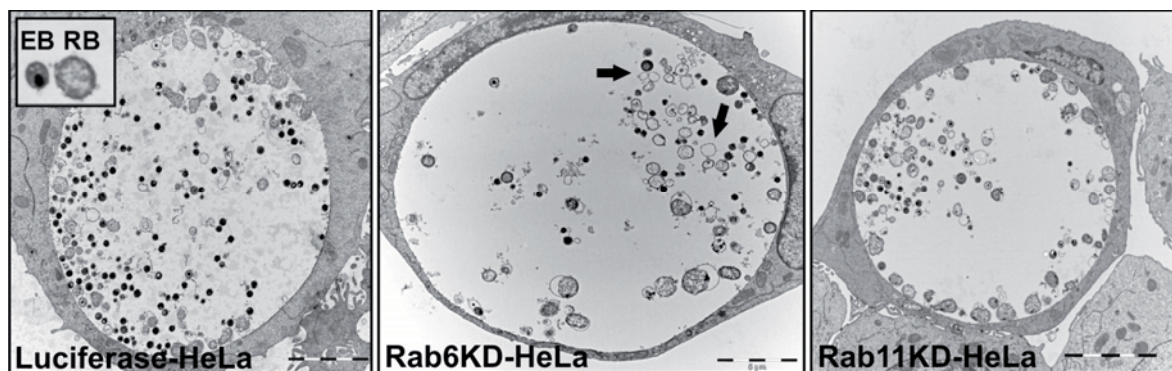
Die Zelllinien wurden mit *C. trachomatis* mit der angegebenen MOI infiziert. Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die Inklusionen 24 h *p.i.* mit einem spezifischen Antikörper gegen chlamydiales MOMP angefärbt und die zelluläre und bakterielle DNA mit Hoechst gegengefärbt. Im Diagramm dargestellt ist die Anzahl der gebildeten Inklusionen pro Nuclei + Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

### 3.3.7 Ultrastrukturelle Analyse von *C. trachomatis*-infizierten *knock down* Zellen

Der Verlust der Proteine Rab6 und Rab11 hatte keine Auswirkungen auf die Etablierung einer Infektion. Hier stellt sich die Frage, ob es im weiteren Verlauf des Infektionszyklus zu Beeinträchtigungen in der Ausbildung infektiöser Partikel, den sogenannten EK, kommt.

Chlamydien besitzen zwei unterschiedliche Lebensformen, die wie bereits erläutert, als EK und RK bezeichnet werden. EK und RK unterscheiden sich deutlich in ihrer Elektronendichte. In elektronenmikroskopischen Bildern erscheinen EK als ca. 300 nm große, elektronendichte Partikel, während RK größer (ca. 1 µm) und weniger elektronendicht sind. Die Durchführung ultrastruktureller Analysen sollte Aufschluss darüber geben, welche chlamydialen Formen in welcher Anzahl in den *C. trachomatis*-infizierten stabil transduzierten Zelllinien vorlagen. Abb. 3.18 zeigt je eine repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme einer *C. trachomatis*-infizierten Zelle nach 42 h. In den infizierten Kontrollzellen hat der Großteil der in der Inklusion befindlichen Partikel bereits in EK rückdifferenziert und nur noch wenige

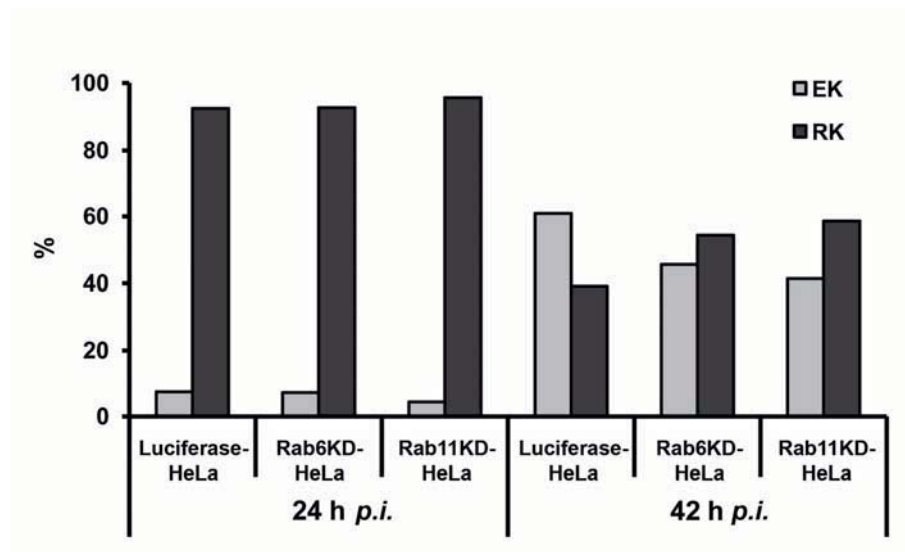
RK sind erkennbar. Dies entspricht einem normalen chlamydialen Zyklus, bei dem sich 40-48 h nach Infektion metabolisch aktive RK in infektiöse EK rückdifferenzieren. Im Gegensatz dazu befinden sich in den *C. trachomatis*-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa signifikant weniger chlamydiale Partikel in der Inklusion, von denen die meisten als RK identifiziert werden konnten. Interessanterweise konnten in Inklusionen der infizierten Rab6KD-HeLa-Zelllinie mehrere leere Bakterienhüllen, so genannte *ghosts* (chlamydiale Geister) nachgewiesen werden.



**Abb. 3.18 Elektronenmikroskopische Analyse von Inklusionen in *knock down* Zellen**

42 h nach Infektion mit *C. trachomatis* (MOI 1) wurden stabil transduzierten *knock down* Zellen fixiert und Ultradünnschnitte hergestellt. Bildgenerierung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop. Die Ausschnittsvergrößerung veranschaulicht die beiden vorliegenden chlamydialen Formen innerhalb der Inklusion, EK (ca. 300 nm) und RK (ca. 1 µm). Pfeile kennzeichnen leere Bakterienhüllen. Messbalken entsprechen 5 µm.

Das Verhältnis von EK zu RK in den jeweiligen Zelllinien wurde in einer quantitativen Analyse bestimmt und als Balkendiagramm in Abb. 3.19 dargestellt. Die Inklusionen in je 30 Zellen wurden 24 h und 42 h nach Infektion ausgezählt und die prozentuale Menge an EK und RK bestimmt. 24 h nach Infektion war das prozentuale Verhältnis von RK und EK in allen drei Proben gleich. 42 h nach Infektion wurden in Kontrollzellen mehr EK als RK nachgewiesen. Dagegen lagen in den Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa prozentual mehr RK vor. Diese Untersuchungen unterstützen die Daten aus der Infektivitätsbestimmung. Auch diese zeigten, dass der funktionelle Ausfall von Rab6 und Rab11 die Umwandlung in infektiöse Partikel beeinträchtigte und damit zu einer verminderten Infektivität der Nachkommenschaft führte.

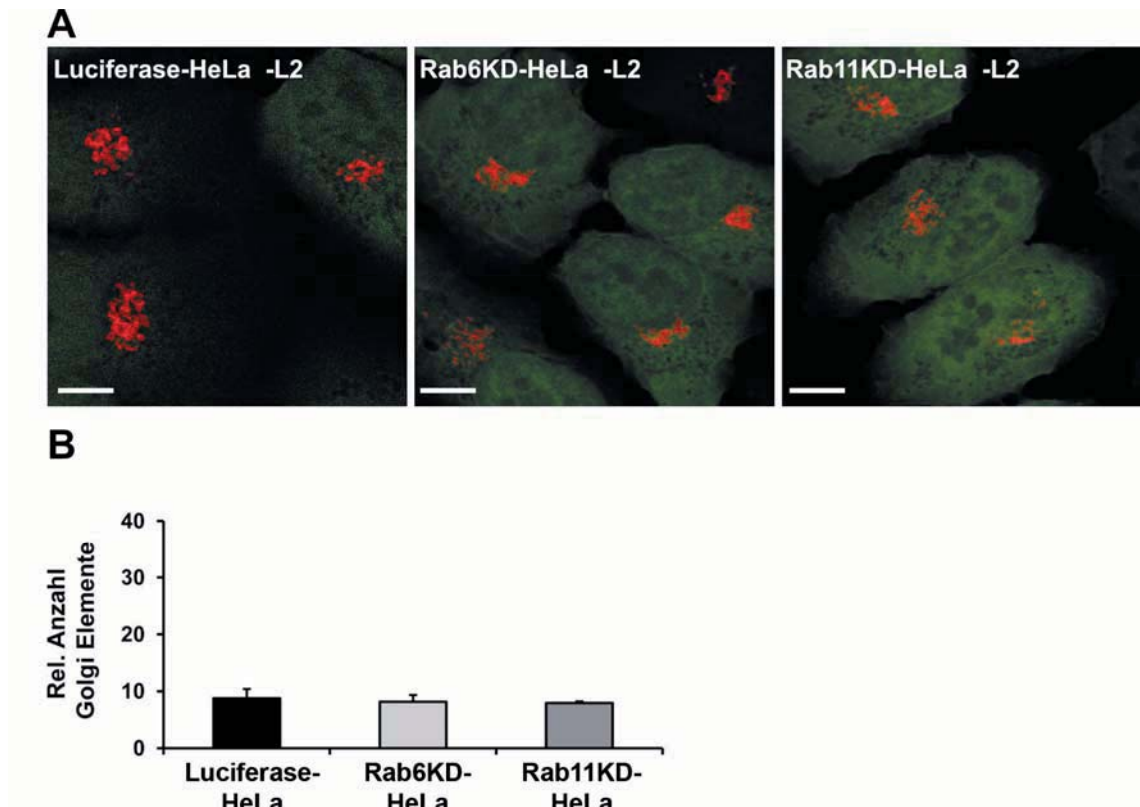


**Abb. 3.19 Prozentuale Quantifizierung der Anzahl von EK und RK in *knock down* Zellen**

Quantitative Auswertung der vorher beschriebenen Ultradünnschnitte 24 h und 42 h nach *C. trachomatis* Infektion. Die Anzahl der in der Inklusion von jeweils 30 Zellen vorliegenden EK und RK (aus zwei unabhängigen Experimenten) wurde ausgezählt und als Balkendiagramm in % zur gesamten Anzahl der chlamydialen Partikel dargestellt.

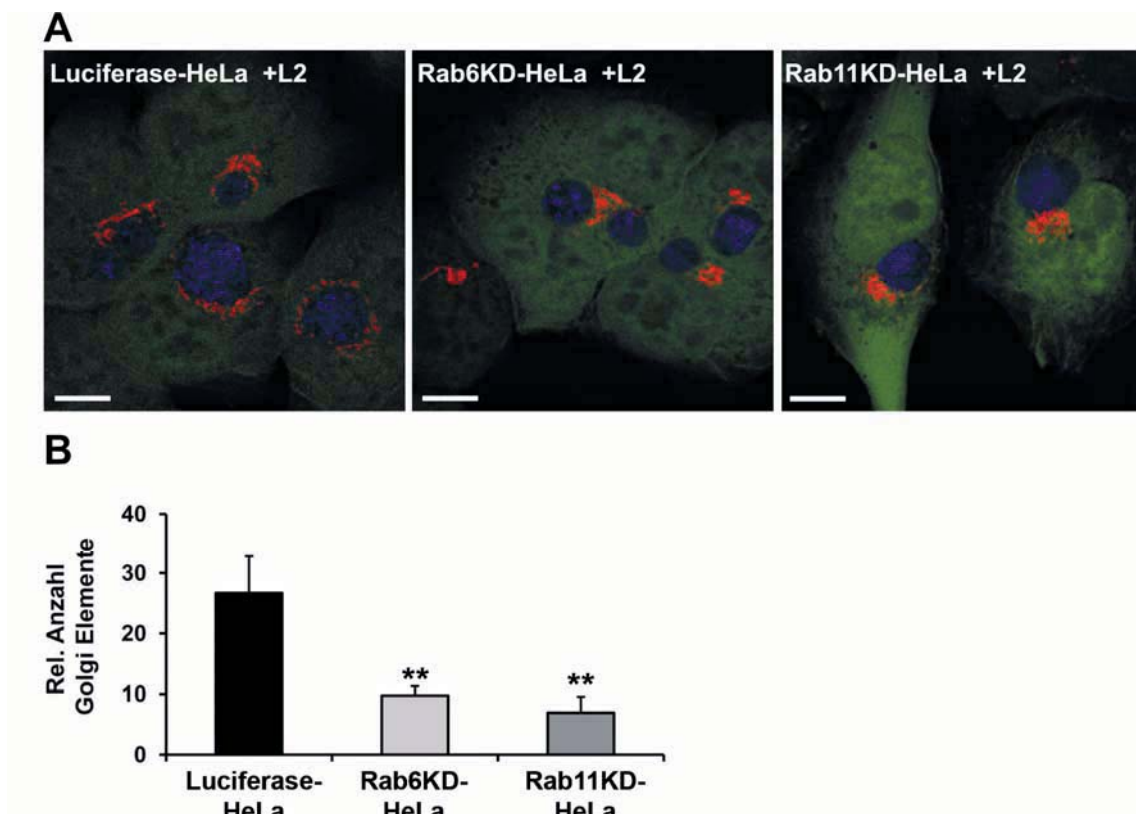
### 3.3.8 Morphologische Erscheinung des Golgi-Apparates in nicht-infizierten und *C. trachomatis*-infizierten Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen

Zur Untersuchung der Golgi-Struktur in stabil transduzierten Zellen wurde ein Ansatz mit *C. trachomatis* infiziert und ein zweiter Ansatz schein-infiziert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse. In den schein-infizierten Zellen hatte der *knock down* von Rab6 und Rab11 keine Auswirkung auf die Struktur des Golgi-Apparates (Abb. 3.20 A). Morphologisch erschien dieser dicht gepackt, kompakt und proximal zum Nukleus lokalisiert. Interessanterweise konnte in infizierten Zellen mit permanenten *knock down* eine Infektion mit *C. trachomatis* nicht, wie im ersten Teil der Arbeit (Abb. 3.1 und Abb. 3.6) dargestellt, die Struktur des Golgi-Apparates aufbrechen und zu einer Verteilung GM130-positiver Signale um die Inklusion führen (Abb. 3.21 A). Die quantitative Auswertung der Golgi-positiven Strukturen in schein-infizierten und infizierten Zellen unterstützt die Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz. In infizierten Kontrollzellen konnte eine deutlich erhöhte Anzahl an Golgi-positiven Strukturen nachgewiesen werden, während die Anzahl in Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen nicht variierte (Abb. 3.20 B und Abb. 3.21 B).



**Abb. 3.20 Golgi-Struktur in schein-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa**

**(A)** Stabil transduzierte Zellen (grüner Kanal) wurden für Immunofluoreszenzanalysen der Golgi-Struktur angefärbt. Der Nachweis von cis-Golgi-Strukturen erfolgte über den spezifischen Antikörper GM130 (roter Kanal). Die Auswertung wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt. Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** Quantitative Analyse der relativen Anzahl an Golgi-Elementen in den untersuchten Zelllinien. Dazu wurden aus der vorherigen Immunfluoreszenz Zellen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen und die Anzahl der roten Elemente (Golgi-Apparat) aus je 30 Zellen nach einem festgelegten Grenzwert im Programm ImageJ ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

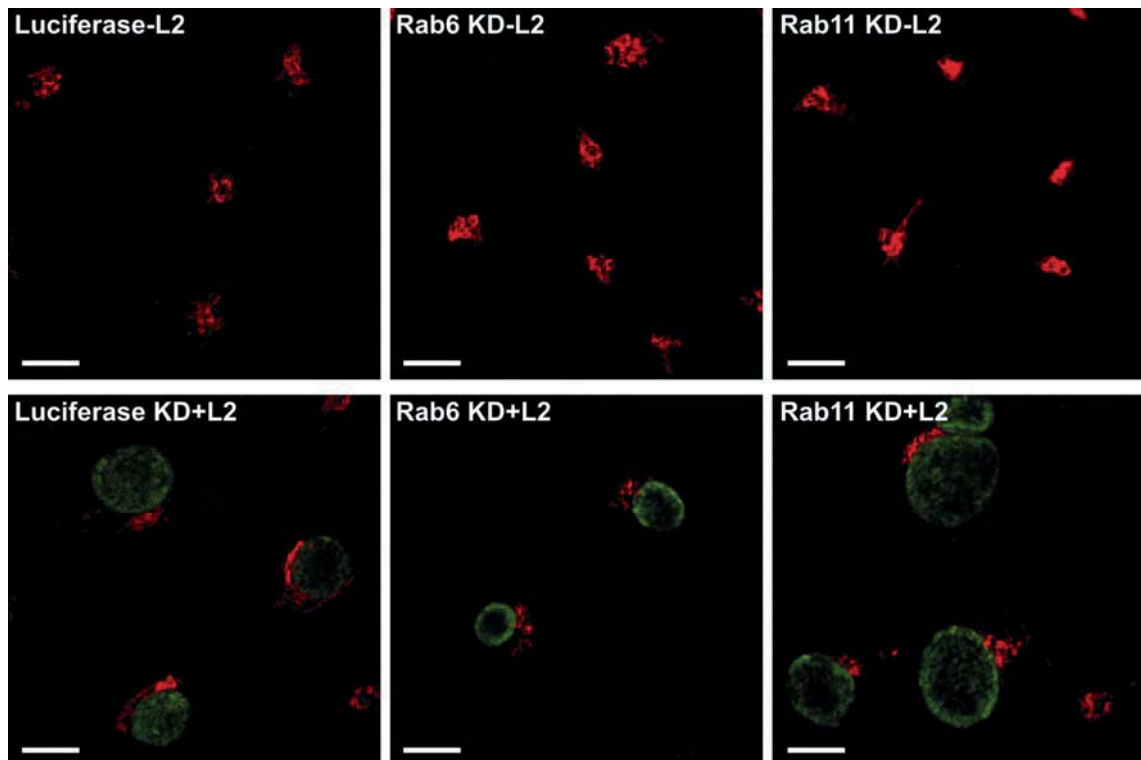


**Abb. 3.21 Golgi-Struktur in *C. trachomatis*-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa**

**A)** Stabil transduzierte Zellen (grüner Kanal) wurden für 24 h mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert und anschließend für die Immunfluoreszenzanalyse angefärbt. Der Nachweis von cis-Golgi-Strukturen und Inklusionen erfolgte über die spezifischen Antikörper GM130 (roter Kanal) und LPS (blauer Kanal). Die Auswertung wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt. Dargestellt sind die Überlagerungen. Messbalken entsprechen 10  $\mu$ m. **(B)** Quantitative Analyse der relativen Anzahl an Golgi-Elementen in den untersuchten Zelllinien. Dazu wurden aus der vorherige Immunfluoreszenz infizierte Zellen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen und die Anzahl der roten Elemente (Golgi-Apparat) aus je 30 Zellen nach einem festgelegten Grenzwert im Programm ImageJ ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung \*\*p- Wert<0,01.

Vergleichende Untersuchungen der Golgi-Struktur in siRNA-behandelten HeLa-Zellen zeigten konsistent den gleichen Phänotyp wie im shRNA-vermittelten *knock down* (Abb. 3.22). Die Infektion konnte unter Verlust der Rab-Proteine den Golgi-Apparat nicht fragmentieren. In diesen Versuchen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Inklusionen in Rab11-siRNA-behandelten Zellen größer als in den Kontrollzellen waren.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Chlamydien-induzierte Golgi-Fragmentierung durch den Ausfall der Proteine Rab6 und Rab11 aufgehoben werden kann.



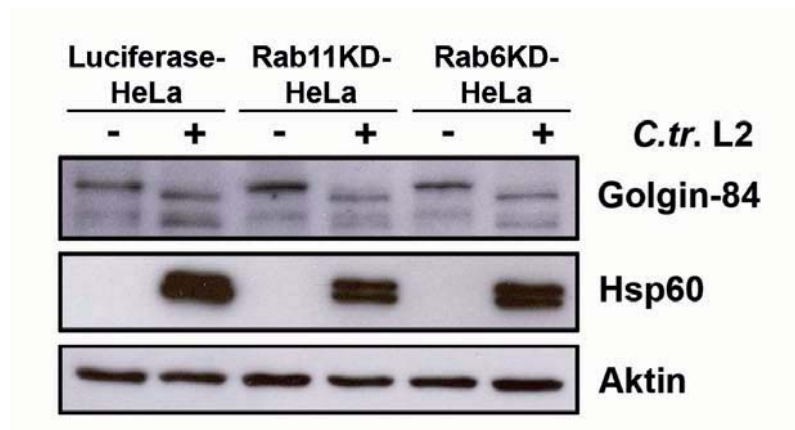
**Abb. 3.22 Golgi-Struktur in Rab6- und Rab11-siRNA-behandelten HeLa-Zellen**

siRNA-behandelte Zellen wurden entweder für 24 h schein-infiziert (obere Reihe) oder mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert (untere Reihe) und anschließend in der Immunfluoreszenz analysiert. Der Nachweis von cis-Golgi-Strukturen und der Inklusion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen GM130 (roter Kanal) und chlamydiales LPS (grüner Kanal) an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Dargestellt sind die Überlagerungen. Messbalken entsprechen 10 µm. KD, *knock down*

### 3.3.9 Spaltung von Golgin-84 in stabilen *knock down* Zellen

Die Fragmentierung des Golgi-Apparates geht mit der Spaltung des Golgi-Proteins Golgin-84 einher (Heuer *et al.*, 2008). Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob Golgin-84 trotz der ausbleibenden Fragmentierung in Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen prozessiert wird. Lysate der stabil transfizierten und infizierten Zellen wurden im Immunoblot untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Spaltung von Golgin-84 (Abb. 3.23). Die Spaltung von Golgin-84 lässt sich demzufolge wahrscheinlich auf einen Rab6- und Rab11-unabhängigen Mechanismus zurückführen.





**Abb. 3.23 Golgin-84 Spaltung in den stabilen Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa**

Zellen wurden mit *C. trachomatis* (C.tr. L2) infiziert (MOI 2) und nach 26 h lysiert. Die Immunodetektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Golgin-84 und Hsp60. Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern als Ladekontrolle nachgewiesen.

### 3.4 Untersuchungen zum Transport von Sphingolipiden in die Inklusion unter Verlust von Rab6 und Rab11

Rab6 und Rab11 sind in Transportprozessen innerhalb des Golgi-Apparates, als auch auf Routen zwischen dem endosomalen System und dem trans-Golgi Netzwerk (TGN) beteiligt (Zerial und McBride, 2001). Die unterbundene Golgi-Fragmentierung beim Verlust von Rab6 und Rab11 könnte einen unzureichenden Transport von Sphingolipiden aus dem Golgi-Apparat in die Inklusion zur Folge haben. Diese Unterversorgung könnte zu der beobachteten Verminderung der Anzahl infektiöser Nachkommen führen.

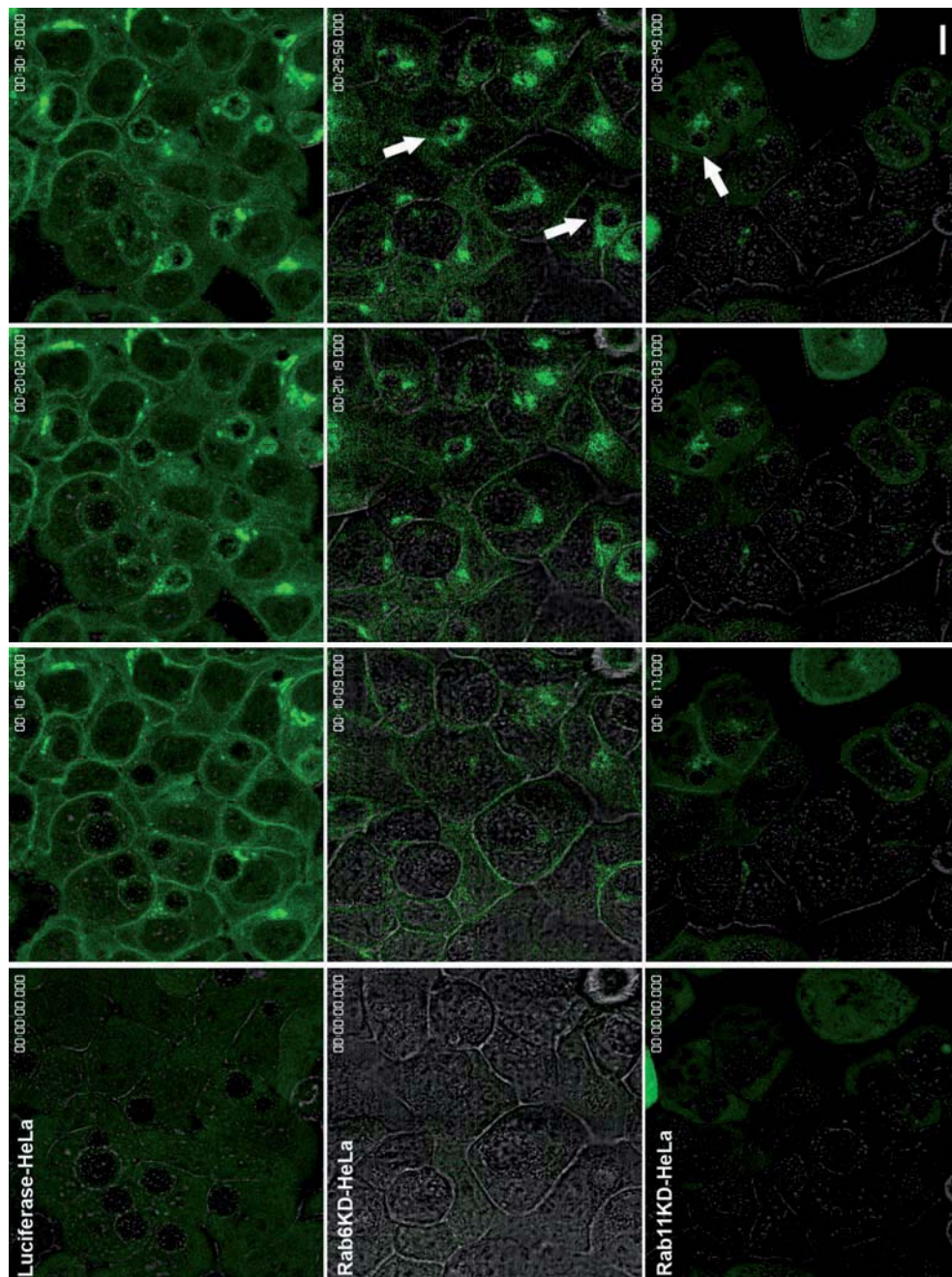
Der Transport von Sphingolipiden in die Inklusionsmembran und die Bakterienmembran wurde mittels Lebendzellmikroskopie beobachtet (Abb. 3.24). Die stabilen *knock down* Zelllinien wurden für 26 h mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert. Die Zugabe des BODIPY-FL Fluorophor gekoppelten Ceramides erfolgte direkt unter dem konfokalen Mikroskop, wobei der intrazelluläre Transport der Fluoreszenzprobe über einen Zeitraum von 30 Min. detektiert wurde. Dargestellt sind repräsentative Standbilder dieser Aufnahmen. Die Inklusionen erkennt man zu Beginn der Aufnahme als runde, dunkle Bereiche in den GFP-exprimierenden Zellen (unterlegt ist der Phasenkontrast). Nach Zugabe des FL-gekoppelten Ceramides inseriert dieses an die Plasmamembran. Nach ca. 10 Min. ist eine deutliche ringförmige Färbung an den Inklusionsmembranen erkennbar. Im weiteren Verlauf färben

sich die gesamten Inklusionen in den Luciferase-Kontrollzellen durch Aufnahme des Lipides in die Bakterien grün an.

Im Gegensatz dazu kann in infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa zwar die Aufnahme und der Transport des fluoreszierenden Ceramides zum Golgi-Apparat beobachtet werden, allerdings wird dieses nur in sehr geringer Menge in die Inklusionen aufgenommen. Die Inklusionen verbleiben dunkel. Interessanterweise kann ein schwaches grünes Signal um die Inklusionen beobachtet werden (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.24).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der funktionelle Ausfall von Rab11 und Rab6 die Aufnahme von Sphingolipiden in die Bakterien blockiert. Dieses könnte eine Ursache für die massive Störung der Rückdifferenzierung in infektiöse Partikel darstellen.





**Abb. 3.24 Transport von Sphingolipiden in die Inklusion in Kontroll-, Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa**

Standbilder des Sphingolipidtransportes aus der Lebendzellmikroskopie. Stabil transduzierte Zellen wurden für 26 h mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert und nach Zugabe von 30 nM BODIPY-FL markiertem Ceramid über eine Dauer von 30 min an einem konfokalen Mikroskop beobachtet. Pfeile kennzeichnen Fluoreszenz-markiertes Ceramid an der Inklusion. Messbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

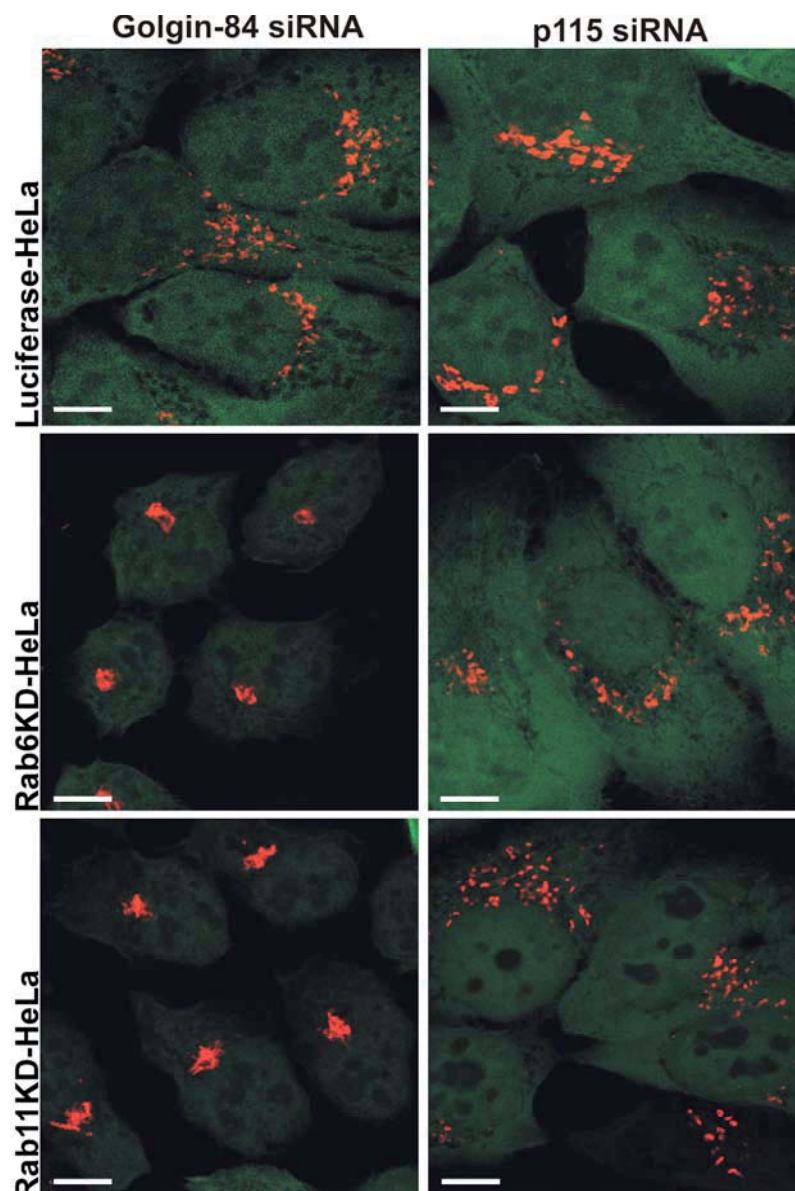
### **3.5 Untersuchungen zum simultanen Verlust von Rab-Proteinen und Golginen**

#### **3.5.1 Analyse der Golgi-Struktur nach simultaner Herunterregulation von Rab-Proteinen und Golginen**

In den vorangegangenen Analysen konnte die Bedeutung des Verlustes von Golgi-Strukturproteinen und Rab-Proteinen für die chlamydialen Entwicklung gezeigt werden. Das Ausschalten von Golginen, wie Golgin-84, Giantin, Gpp130 und p115 wirkte sich positiv auf die chlamydiale Vermehrung aus, während der Verlust der Rab-Proteine Rab6 und Rab11 zu einer stark beeinträchtigten bakteriellen Replikation führte. Für den strukturellen Aufbau des Golgi-Apparates sind, wie bereits beschrieben, hauptsächlich Golgine verantwortlich (Short *et al.*, 2005) und diese können mit Rab-Proteinen interagieren (Diao *et al.*, 2003; Rosing *et al.*, 2007; Burguete *et al.*, 2008).

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die simultane Herunterregulation infektivitäts-fördernder und infektivitätshemmender Faktoren auswirkt. Dazu wurden die Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa mit siRNAs gegen die Zielproteine p115 und Golgin-84 behandelt, mittels Immunfluoreszenz analysiert und die bakterielle Vermehrungsrate bestimmt.

Zunächst wurde die Golgi-Struktur in den siRNA-behandelten stabilen *knock down* Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 3.25). Dazu wurde die Verteilung des cis-Golgi-Markers Gpp130 bestimmt. Die nicht-infizierten Luciferase-Kontrollzellen zeigten den erwarteten Phänotyp nach Golgin-84- und p115-*knock down*. Der Golgi-Apparat ist deutlich fragmentiert. Hingegen hat der Verlust von Golgin-84 und p115 in den stabilen Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen unterschiedliche Golgi-Morphologien zur Folge. p115-Verlust fragmentierte den Golgi-Apparat vergleichbar zu den Kontrollzellen, unabhängig vom Verlust der beiden Rab-Proteine. Im Gegensatz dazu stabilisierte der Verlust von Rab6 oder Rab11 positiv die Golgi-Struktur nach Herunterregulation von Golgin-84. Der Golgi-Apparat zeigte morphologisch immer noch eine kompakte und dichte Struktur. Quantitative Auswertungen der relativen Anzahl an Golgi-Elementen in den Proben bestätigten die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz (Abb. 3.26).



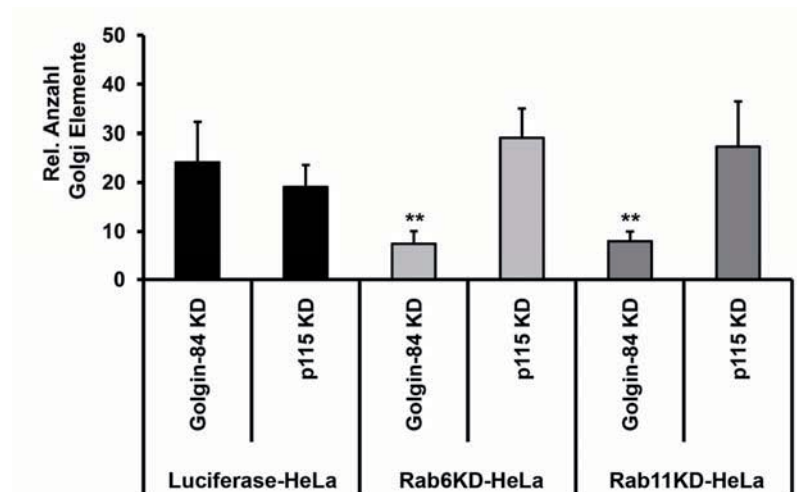
**Abb. 3.25 Golgi-Struktur in nicht-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa nach simultaner Herunterregulation von p115 oder Golgin-84**

Stabil transduzierte Zellen (grüner Kanal) wurden mit siRNAs transfiziert, die spezifisch gegen Golgin-84 und p115 gerichtet waren. Mittels spezifischer Antikörper gegen das cis-Golgi-Protein Gpp130 (roter Kanal) wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse angefärbt und an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Dargestellt sind die Überlagerungen. Messbalken entsprechen 10µm.

Die siRNA-vermittelte Fragmentierung in den Kontrollzellen hatte eine hohe Anzahl positiver Golgi-Elemente zur Folge. Dagegen konnte die kompakte Struktur des Golgi-Apparates in den Zelllinien Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa durch Verlust von Golgin-84 nicht aufgelöst werden und die Anzahl positiver Strukturen lag deutlich unter denen der Kontrollzelllinie.

Der Verlust von p115 in Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa hingegen zeigte übereinstimmend zur beobachteten Golgi-Fragmentierung, dreimal mehr positive Golgi-Elemente.

Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen, dass der Verlust der Proteine Rab6 und Rab11 die Golgin-84-induzierte, nicht aber eine p115-abgeleitete Fragmentierung des Golgi-Apparates verhindern.



**Abb. 3.26 Quantifizierung der Golgi-Fragmentierung in nicht-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa nach simultaner Herunterregulation von p115 oder Golgin-84**

Für die Quantifizierung der Golgi-Fragmentierung in nicht-infizierten Zellen, wurden die stabilen Zelllinien mit spezifischen siRNAs gegen Golgin-84 und p115 transfiziert. Die Detektion des Golgi-Apparates mittels Immunfluoreszenz erfolgte mit drei spezifischen Antikörpern gegen die cis-Golgi-Proteine Gpp130, Giantin und GM130. Die Dokumentation erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Bilder wurden anschließend im Programm ImageJ mittels eines festgelegten Grenzwertes ausgewertet. Dargestellt ist die relative Anzahl von Golgi-Signalen + Standardabweichung aus je 30 Zellen. \*\*p- Wert<0,01. KD, *knock down*

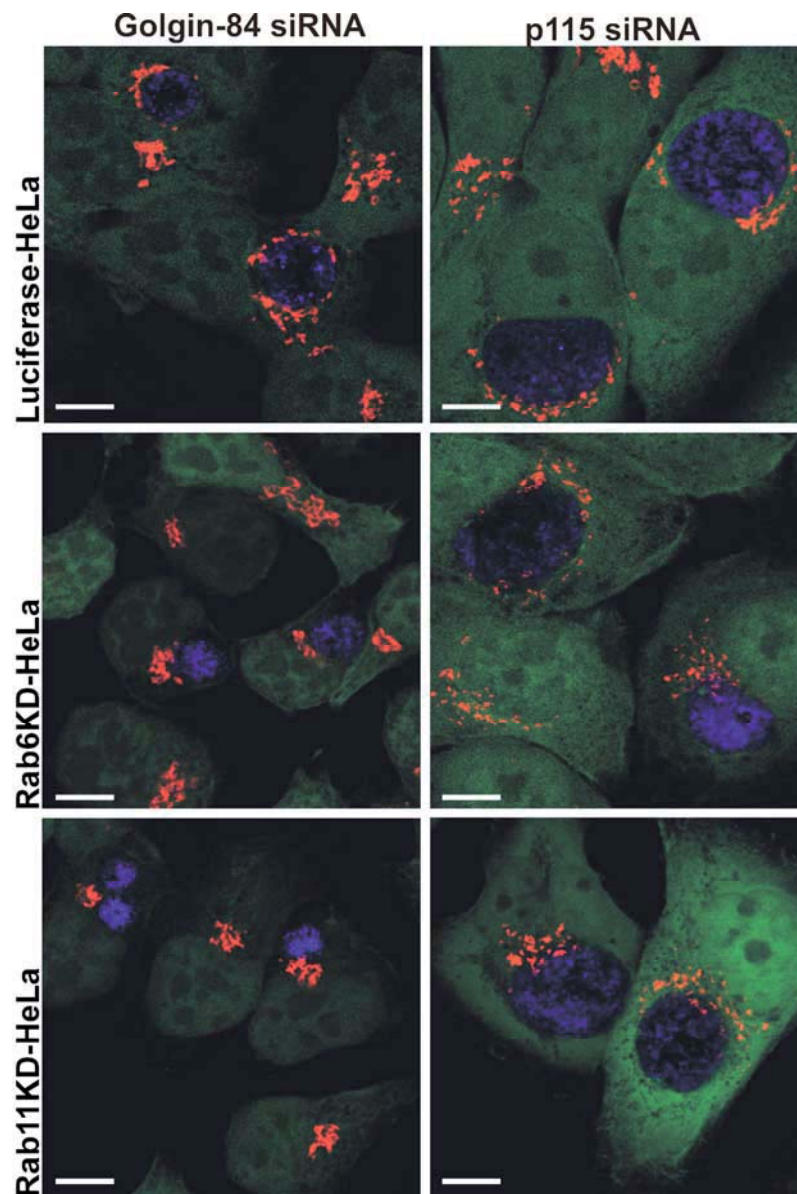
### 3.5.2 Untersuchung der Golgi-Struktur nach simultaner Herunterregulation von Rab-Proteinen und Golginen in Chlamydien-infizierten Zellen

Parallel wurde die Golgi-Struktur in *C. trachomatis*-infizierten und siRNA-behandelten stabilen *knock down* Zellen untersucht (Abb. 3.27). In infizierten Kontrollzellen war die beschriebene Fragmentierung des Golgi-Apparates deutlich erkennbar. In den Rab-Protein *knock down* Zellen hingegen konnte trotz Infektion und Verlust von Golgin-84, eine Auflösung der Golgi-Struktur nicht nachgewiesen werden. Die Infektion in p115-siRNA-behandelten Zellen führte zu einem stark fragmentierten Golgi-Apparat, unabhängig vom Verlust von einem der beiden Rab-Proteine. Unterstützt wurden die mikroskopischen



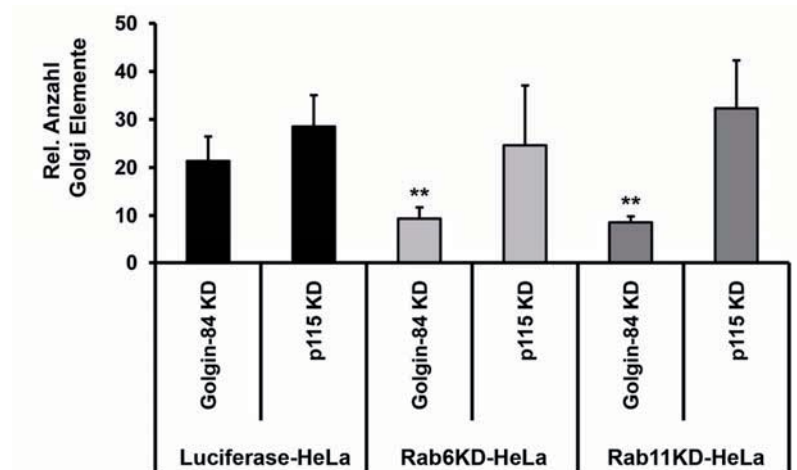
Analysen durch die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Golgi-positiven Elementen. Abb. 3.28 zeigt die Erhöhung an Golgi-Elementen im siRNA-vermittelten p115-*knock down*. Interessanterweise beobachtet man im Gegensatz dazu in den Rab-Protein-*knock down* Zellen nur halb so viele Golgi-Elemente nach Golgin-84-siRNA-Behandlung, wie in den Kontrollzellen.

Insgesamt lassen diese Untersuchungen erkennen, dass die Chlamydien-induzierte Fragmentierung des Golgi-Apparates unter Ausfall von Golgin-84 vermutlich über die Proteine Rab6 und Rab11 reguliert werden kann. Dagegen scheint die über p115-siRNA und *C. trachomatis*-Infektion induzierte Auflösung des Golgi-Apparates unabhängig von Rab6- und Rab11-*knock down*-vermittelten Prozessen zu sein.



**Abb. 3.27 Golgi-Struktur in *C. trachomatis*-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa nach simultaner Herunterregulation von p115 oder Golgin-84**

Stabil transduzierte Zellen (grüner Kanal) wurden mit siRNAs gegen Golgin-84 und p115 behandelt und anschließend mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen das cis-Golgi-Protein Gpp130 (roter Kanal) und chlamydiales Hsp60 (blauer Kanal) und wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Dargestellt sind die Überlagerungen der einzelnen Proben. Messbalken entsprechen 10 µm.



**Abb. 3.28 Quantifizierung der Golgi-Fragmentierung in *C. trachomatis*-infizierten Rab6KD-HeLa und Rab11KD-HeLa nach simultaner Herunterregulation von p115 oder Golgin-84**

Für die Analyse der Golgi-Fragmentierung, wurden die stabilen Zelllinien mit spezifischen siRNA gegen Golgin-84 und p115 transfiziert und anschließend mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert. Die Detektion des Golgi-Apparates mittels Immunfluoreszenz erfolgte mit drei spezifischen Antikörpern gegen die cis-Golgi-Proteine Gpp130, Giantin und GM130. Von diesen Proben wurden je 30 infizierte Zellen an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop dokumentiert. Die Bilder wurden anschließend im Programm ImageJ mittels einem festgelegten Grenzwertes ausgewertet. Dargestellt ist die relative Anzahl von Golgi-Signalen + Standardabweichung, \*\*p- Wert<0,01. KD, knock down

### 3.5.3 Vergleich der Infektivitäten in Golgin-84- und p115-siRNA-behandelten stabilen Rab6- und Rab11-knock down Zellen

Der funktionelle Ausfall der in dieser Arbeit untersuchten Wirtszellproteine führte zu verändertem Vermehrungsverhalten der Chlamydien. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten die Notwendigkeit von Rab6 und Rab11 für eine produktive chlamydiale Entwicklung. Parallel konnte eine Begünstigung der Infektion durch Ausschalten von Golgi-Proteinen nachgewiesen werden. Sowohl Infektion, als auch RNAi gegen Golgi-Strukturproteine, hatten eine Auflösung der Struktur des Golgi-Apparates zur Folge. Konnte der Golgi-Apparat bereits vor der Infektion durch eine siRNA-Behandlung fragmentiert werden, war das von großem Vorteil für die Chlamydien-Vermehrung; die Infektivität stieg stark an. Dagegen führte der knock down von Rab6 und Rab11 zu keinem Zerfall des Golgi-Apparates und die Vermehrung der Chlamydien war negativ beeinträchtigt (Tab. 3.1). Im Folgenden sollte gezeigt werden, welche Folge diese Resultate auf die Entwicklung von Chlamydien im simultanen knock down hatten.

**Tab. 3.1 Vergleich der Infektivitäten und der Struktur des Golgi-Apparates in *knock down* Zellen**

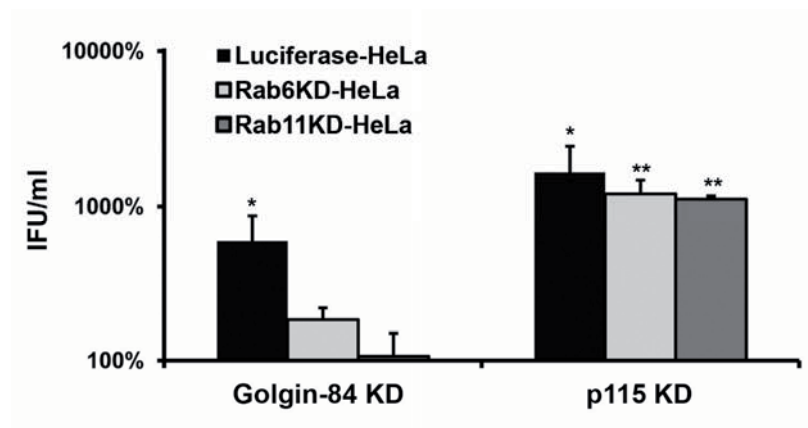
Vergleichende Zusammenfassung der Infektivitäten und der Golgi-Struktur nach Verlust des jeweils angegebenen Proteins. Pfeile kennzeichnen eine Erhöhung oder Reduktion der Infektivität. (+) entspricht einer beobachteten Fragmentierung des Golgi-Apparates. KD, *knock down*

	Infektivität	Golgi-Fragmentierung durch siRNA	Golgi-Fragmentierung durch <i>C. trachomatis</i>
Rab6 KD	↓	-	-
Rab11 KD	↓	-	-
Golgin-84 KD	↑	+	+
p115 KD	↑	+	+

Für die Bestimmung der Infektivitäten wurden stabil transduzierte und siRNA-behandelte Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und nach 48 h *p.i.* auf neue HeLa-Zellen titriert. Die Auswertung der gebildeten Inklusionen in Abb. 3.29 ergab, dass der Verlust von p115 eine zehnfache Erhöhung der Infektivität bewirkte, unabhängig vom Verlust eines der beiden untersuchten Rab-Proteine. Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen der Golgi-Struktur in der Immunfluoreszenz und den Daten der Infektivitäten in siRNA-behandelten HeLa-Zellen überein, die zeigten, dass die Fragmentierung des Golgi-Apparates die Infektivität der Bakterien förderte (Abb. 3.9 und Abb. 3.29). Ob es sich bei diesem Mechanismus um einen direkten Effekt auf die Bakterien oder indirekte Ereignisse durch die Umkehrung der Golgi-Struktur handelt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise hatte dagegen der Verlust von Golgin-84 unter Ausfall von Rab6 oder Rab11 keine Erhöhung der Infektivität zur Folge, sondern beeinflusste die Infektivität im Vergleich zu schein-behandelten Zellen nicht. Rab6 und Rab11 scheinen in der Golgin-84-abhängigen Golgi-Fragmentierung eine Rolle zu spielen.





**Abb. 3.29 Bestimmung der chlamydialen Infektivitäten in Zellen mit simultanem *knock down* (KD) von Golgi-Proteinen und Rab-Proteinen**

Stabil transduzierte Zellen wurden zunächst mit siRNAs transfiziert, die spezifisch gegen Golgin-84 und p115 gerichtet waren und anschließend mit *C. trachomatis* (MOI 3) infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Anzahl inklusionsformender Partikel durch Titration auf frischen HeLa-Zellen bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte + Standardabweichung der relativen IFU/ml in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten dar. \*  $p$ -Wert<0,05, \*\* $p$ -Wert<0,01.

## IV. DISKUSSION

Das Überleben der obligat intrazellulären Chlamydien hängt von der Etablierung und Aufrechterhaltung ihrer Nische, der Inklusion, ab. Hierfür müssen die Bakterien mit verschiedenen Proteinen der Wirtszelle interagieren. Da es zurzeit nicht möglich ist *Chlamydiaceae* gerichtet genetisch zu manipulieren, bietet die RNA-Interferenz Technologie (RNAi) eine effektive und spezifische Methode, die Expression von ausgewählten Zielgenen in der Wirtszelle zu supprimieren. Damit erlaubt diese Methode Auswirkungen des Proteinverlustes auf die Chlamydien zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte ein essentieller Beitrag zum Verständnis der Funktion des Golgi-Apparates während einer Chlamydien-Infektion geleistet werden. Wechselwirkungen mit Golgi-Strukturproteinen scheinen eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Nährstoffen und Molekülen zu spielen. Chlamydien brechen die Struktur des Golgi-Apparates auf, was zu einer Anlagerung von Golgi-positiven Elementen geringer Größe um die Inklusion führt (Heuer *et al.*, 2008). Der Zerfall der Golgi-Struktur korreliert zeitlich mit der proteolytischen Spaltung von Golgin-84. Die Verwendung von RNAi gegen ausgewählte strukturelle Golgi-Proteine ergab, dass der Verlust dieser Proteine zur Fragmentierung des Golgi-Apparates führte. Dies begünstigte nachfolgend den chlamydialen Entwicklungszyklus und resultierte in einer vermehrten Produktion infektiöser Bakterien.

Die Auflösung der Golgi-Struktur in vesikuläre Einheiten ließ auf eine mögliche Interaktion mit Rab-Proteinen schließen. Um die Bereitstellung von Nährstoffen vesikulärer Form zur Inklusion genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Rab-Proteine, als entscheidende Regulatoren für intrazellulären Vesikeltransport, mittels RNAi herunterreguliert. Der Effekt des funktionellen Ausfalls wurde anhand der chlamydialen Vermehrungsrate bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass einige Rab-Proteine den Entwicklungszyklus spezifisch beeinflussen, während andere keine Bedeutung hatten. Der Verlust von Rab6 und Rab11 führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl infektiöser Nachkommen. Der Großteil der Bakterien konnte den Entwicklungszyklus nicht vollständig abschliessen und nur eine geringe Anzahl infektiöser Partikel ausbilden.

Parallel konnte gezeigt werden, dass unter Funktionsverlust von Rab6 und Rab11 der Golgi-Apparat nicht mehr fragmentierte und der Transport von Golgi-abgeleiteten Sphingolipiden durch die Inklusionsmembran zu den Bakterien herabgesetzt war (Rejman Lipinski *et al.*). In

Golgin-84-defizienten Zellen konnte abschließend demonstriert werden, dass der Verlust von Rab6 oder Rab11 in diesen Zellen die Golgi-Fragmentierung verhinderte und die erhöhte Infektivität unter Ausfall von Golgin-84 wieder absenkte.

#### **4.1 Bedeutung der Golgi-Fragmentierung für Chlamydien-Infektionen**

##### **4.1.1 *C. trachomatis*-Infektion führt zur Auflösung der Struktur des Golgi-Apparates**

Die intrazelluläre Lebensweise von Chlamydien erfordert zur Gewinnung von Nährstoffen eine Interaktion des Bakteriums mit den Transportwegen der Wirtszelle. Besonders wichtig für das chlamydiale Wachstum und die Vermehrung der Bakterien ist u.a. die Versorgung mit Lipiden (Hackstadt *et al.*, 1995; Hackstadt *et al.*, 1996; Scidmore *et al.*, 1996a; Wylie *et al.*, 1997; Carabeo *et al.*, 2003). Vor allem die Rekrutierung von Sphingolipiden aus dem Golgi-Apparat zur Inklusion stellt eine entscheidende Wechselwirkung des Bakteriums mit der Wirtszelle dar (Hackstadt *et al.*, 1995; Hackstadt *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass im Verlauf einer Infektion mit *C. trachomatis* der Golgi-Apparat in mehrere kleine Einheiten zerfiel und sich um die Inklusion lagerte, was sich vorteilhaft auf die Chlamydien auswirkte (Heuer *et al.*, 2008).

Die Auflösung der Golgi-Struktur nach Chlamydien-Infektion zeigt eine einzigartige Interaktion zwischen der Wirtszelle und einem intrazellulären Bakterium. Bisher wurde für kein weiteres obligat intrazelluläres Bakterium eine ähnlich induzierte Fragmentierung des Golgi-Apparates gezeigt. In einer Publikation mit *Legionella pneumophila* konnte gezeigt werden, dass die ektopische Überexpression des vom Bakterium sekretierten Proteins SidM zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates führte. Ob allerdings eine Infektion mit *Legionella pneumophila* ebenfalls zur Fragmentierung des Golgi-Apparates führen würde, blieb in dieser Studie ungeklärt (Machner und Isberg, 2006).

Golgi-Fragmentierung ist zwar ein durchaus bekanntes Phänomen, allerdings sind die Mechanismen bei weitem noch nicht endgültig entschlüsselt. Die beobachtete Fragmentierung des Golgi-Apparates in der Infektion ähnelte dem Auflösen der Organell-Struktur nach Behandlung mit Zytoskelett-Toxinen ((Heuer *et al.*, 2008), Daten der Arbeitsgruppe). Zur Aufrechterhaltung der normalen Morphologie ist der Golgi-Apparat auf ein intaktes Mikrotubuli- und Aktin-Netzwerk angewiesen. Toxine, wie Nocodazol oder

Cytochalasin, die das Zytoskelett schädigen, führen zur Formierung von Golgi-Ministapeln, die mit den hier beobachteten Fragmenten vergleichbar sind (Cole *et al.*, 1996; Valderrama *et al.*, 1998).

Die Struktur des Golgi-Apparates kann durch verschiedene Modifikationen der Golgine beeinflusst werden (Short *et al.*, 2005). Nähere Untersuchungen mittels Immunodetektion zeigten in dieser Arbeit, dass es während der Infektion und dem Zerfall des Golgi-Apparates zu einer proteolytischen Spaltung des Golgins Golgin-84 kam. In infizierten Zellen konnte eine sequentielle Prozessierung von Golgin-84 in zwei Spaltfragmente nachgewiesen werden; ein ca. 78 kDa und ein ca. 65 kDa großes Fragment. Die Degradation und damit das 78 kDa große Fragment war bereits 16 h *p.i.* nachzuweisen, wohingegen das 65 kDa große Spaltprodukt erst zu späteren Zeitpunkten akkumulierte. 36 h *p.i.* konnte die unprozessierte, volle Länge des Proteins nicht mehr detektiert werden (Heuer *et al.*, 2008).

#### **4.1.2 RNAi-induzierte Golgi-Fragmentierung fördert die chlamydiale Vermehrung**

Die Integrität und Homöostase des Golgi-Apparates vermitteln unter anderem strukturenbende Proteine, die Golgine. Mittels der RNAi-Technik wurden in dieser Arbeit die Folgen des funktionellen Ausfalls von Golgi-Strukturproteinen analysiert. Die Immunfluoreszenz-Auswertung zeigte, dass eine siRNA-Behandlung gegen die Golgi-Proteine Golgin-84, Gpp130, Giantin oder p115 den Golgi-Apparat fragmentierte, und zwar vergleichbar zu der gezeigten Fragmentierung in infizierten Zellen. Dieser durch RNAi erzeugte Strukturverlust des Golgi-Apparates ist konsistent zu bereits veröffentlichten Beobachtungen. Für die Proteine Golgin-84, GM130 und p115 wurde nach der siRNA-Behandlung die Bildung von vesikulären Golgi-Ministapeln beschrieben (Diao *et al.*, 2003; Sohda *et al.*, 2005; Puthenveedu *et al.*, 2006). Golgin-84 wird z.B. für die Ausbildung der Verbindungen der einzelnen Zisternen benötigt (Satoh *et al.*, 2003). p115 hingegen ist am Transport von COPII- und der Bindung von COPI-Vesikeln am cis-Golgi beteiligt (Sonnichsen *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, dass die kontinuierliche Vesikelbildung bei gleichzeitig veränderter Bindung und Fusion der Vesikel an die Golgi-Membran in p115 und Golgin-84 *knock down*-Zellen letztendlich in der vesikulären Zerlegung des gesamten Apparates resultiert.

Die hier untersuchten Proteine Golgin-84, p115 und GM130 werden in der Mitose reguliert, wodurch sie eine wichtige Rolle in der Aufteilung des Golgi-Apparates auf beide Tochterzellen spielen (Lowe *et al.*, 1998; Diao *et al.*, 2003). Durch Phosphorylierung der Golgine GM130 und Golgin-84 und Dephosphorylierung von p115 während der Mitose, wird eine Interaktion dieser Proteine miteinander verhindert, was eine Fragmentierung des Golgi-Apparates und damit eine gleichmäßige Verteilung dieses Organells auf beide Tochterzellen zur Folge hat. Wie weit sich der hier beobachtete Mechanismus der Golgi-Fragmentierung von dem der Mitose unterscheidet, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Die vorteilhafte Auswirkung der Golgi-Fragmentierung während einer Chlamydien-Infektion demonstrierten die Untersuchungen der Infektivitäten nach siRNA-Behandlung gegen Golgi-Strukturproteine. Der funktionelle Ausfall der Golgine und Golgi-assoziierten Proteine Golgin-84, Giantin, Gpp130 und p115 und die damit einhergehende Fragmentierung des Golgi-Apparates, erhöhte die Infektivität der Nachkommenschaft mindestens fünffach. Die vorzeitige Auflösung der Golgi-Struktur durch Ausschalten von spezifischen Golginen ist somit von großem Vorteil für eine effiziente bakterielle Entwicklung. Es ist anzunehmen, dass unter Auflösung der Golgi-Struktur die Bereitstellung von Nährstoffen, vermutlich vorrangig die von Lipiden, verbessert wird.

## **4.2 Rab-Proteine sind wichtig für die chlamydiale Entwicklung**

Die Golgi-Fragmentierung resultierte in der Zerlegung des Golgi-Apparates in viele vesikuläre Strukturen. Für die Regulation des Transportes von Vesikeln sind innerhalb der Wirtszelle vor allem Rab-Proteine verantwortlich. Um zu untersuchen, ob Rab-Proteine den Transport von Nährstoffen zur Inklusion und den Bakterien vermitteln und somit zur Vermehrung der Chlamydien beitragen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Rab-Proteinen aus den verschiedenen intrazellulären Transportrouten mittels RNAi herunterreguliert. Die Auswirkungen des Verlustes dieser Proteine wurden anhand der chlamydialen Vermehrungsrate untersucht. Die Ergebnisse konnten drei Gruppen zugeordnet werden: Rab-Proteinen, die zu einer Erhöhung der Infektivität führten (Rab1); Rab-Proteinen, die die Infektivität über 50% reduzierten (Rab6 und Rab11) und Rab-Proteinen, die die bakterielle Vermehrung nach Proteinfunktionsverlust nicht signifikant beeinflussten (Rab4, Rab10 und Rab2).

Eine größere, ebenfalls auf RNAi basierende Studie zur Aufklärung der Interaktionen von Chlamydien mit der Wirtszelle, wurde von Elwell und Engel durchgeführt (Elwell und Engel, 2005; Elwell *et al.*, 2008). Als Modellsystem wählten die Autoren *Drosophila melanogaster* S2-Zellen. Diese Zellen lassen sich einfach und effizient mit siRNA transfizieren und besitzen, im Gegensatz zu Säugetieren, ein nicht-redundantes Genom. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass S2-Zellen als Modell für die frühe Infektion, den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Inklusion, sowie den Erwerb von Golgi-abgeleiteten Sphingolipiden geeignet sind. Dabei wurde die Primärinfektion in den *knock down* Zellen anhand der Anzahl gebildeter Inklusionen und der Morphologie der Inklusion untersucht. Die Analyse identifizierte auch Rab-Proteine, die die Primärinfektion beeinflussten (Rab1, Rab8, Rab14 und Rab39). Rab6 und Rab11 waren keine Treffer in dieser Studie, was konsistent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, denn die Primärinfektion nach Rab6- oder Rab11-*knock down* war nicht verändert. Allerdings konnten späte Ereignisse der Infektion, wie die Redifferenzierung von RK in EK und die Gewinnung infektiöser Nachkommen, aufgrund der limitierten Replikations- und Überlebensrate von *C. trachomatis* in S2-Zellen, nicht rekonstruiert werden. Dies zeigt zum jetzigen Zeitpunkt die Grenzen des *Drosophila*-Systems auf. Die vorliegende Arbeit hingegen gibt Aufschlüsse über die notwendigen Wirtszellproteine in der etablierten und späten Infektion von humanen Epithelzellen. Der experimentelle Aufbau ermöglichte die Analyse der erzeugten infektiösen Nachkommen, die neue Infektionsrunden einleiten können. Im Unterschied zu der in S2-Zellen durchgeführten Studie, war die vorliegende Arbeit nicht auf frühe Infektionsereignisse, wie die Adhärenz und die Aufnahme von Chlamydien in die Zelle beschränkt, sondern konnte den Infektionsverlauf nach Durchlaufen eines vollständigen Zyklus auswerten.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Inklusionen in den Rab11-siRNA-behandelten Zellen größer waren, als in den stabilen Rab11KD-HeLa-Zellen. Die nach transientem und konstitutiven Herunterregulieren beobachteten unterschiedlichen Inklusionsgrößen können vielfältige, in der jeweiligen experimentellen Vorgehensweise zu suchende Ursachen haben. Einerseits stellt die siRNA-Transfektion der Zellen einen großen Eingriff in die Zelle dar, der mit der Aufnahme und der Verarbeitung einer großen Anzahl von Fremdpartikeln einhergeht. Auf der anderen Seite kann ein permanenter Proteinfunktionsverlust zelluläre Adaptationsprozesse in Gang setzen, in deren Verlauf sich

ein verändertes Proteinexpressionsmuster einstellt, das einen Einfluss auf die Inklusionsgröße haben kann.

#### **4.2.1 Chlamydien können in Rab6- und Rab11-vermittelte Transportwege eingreifen**

Rzomp und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Chlamydien bestimmte Rab-Proteine rekrutieren. In infizierten Zellen lokalisierten EGFP-markierte Rab-Proteine zur Inklusion, wobei die Rekrutierung speziesspezifisch und Rab-Protein-spezifisch erfolgte (Rzomp *et al.*, 2003). Sowohl *C. trachomatis* als auch *Cp. pneumoniae* konnten Rab1, Rab4 und Rab11 rekrutieren. Im Gegensatz dazu wurde eine Assoziation von Rab6 mit Inklusionen nur in *C. trachomatis*-infizierten Zellen und von Rab10 nur in Zellen infiziert mit *Cp. pneumoniae* oder *Cp. muridarum* beobachtet. Diese Daten veranschaulichen sehr gut die selektive Wechselwirkung zwischen der Wirtszelle und den Chlamydien. Die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung für die chlamydiale Entwicklung blieb allerdings ungeklärt.

Die Daten der hier untersuchten Rab-Proteine decken sich mit den Beobachtungen von Scidmore und Mitarbeitern. Rab10 assoziiert nicht mit der *C. trachomatis*-Inklusion und scheint auch keine Bedeutung für die Entwicklung der Bakterien zu haben. Rab6 und Rab11 hingegen lokalisieren zur *C. trachomatis*-Inklusion und deren Verlust verringerte die Vermehrung der Chlamydien um etwa 50%. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass sich das Rab6-mRNA Level in HeLa Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* erhöht, was die Bedeutung von Rab6 in der chlamydialen Entwicklung bekräftigt (Xia *et al.*, 2003).

Die Auswirkungen des Verlustes von Rab6 und Rab11 auf die chlamydiale Replikation lassen vermuten, dass diese beiden Proteine eine Schlüsselrolle in der Akquisition von Nährstoffen, vermutlich vesikulärer Form, an der Inklusionsmembran spielen. Beide Rab-Proteine wurden u.a. als Transportregulatoren in der Verbindung der endozytotischen mit der exozytotischen Route identifiziert (Wilcke *et al.*, 2000; Mallard *et al.*, 2002). Die Endozytose und die Exozytose sind durch die Beförderung von Vesikeln zwischen den Endosomen und dem TGN miteinander verbunden. So führt z.B. der Verlust oder die Überexpression dominant-negativer Mutanten von Rab6 und Rab11 zu einer Blockade des Transportes des Shiga-Toxin B Fragmentes (STxB) von den frühen Endosomen zum TGN (Mallard *et al.*, 2002).

Im Rab6-vermittelten Transport wurden außerdem zwei Rab6-Isoformen beschrieben, die sich nur durch drei Aminosäuren in der GTP-bindenden Domäne unterscheiden (Goud *et al.*, 1990; Antony *et al.*, 1992; Echard *et al.*, 2000; Monier *et al.*, 2002; Del Nery *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit verwendete siRNA gegen Rab6 erkennt eine Sequenz homolog zu beiden Formen und führt somit wahrscheinlich zum simultanen *knock down* beider Isoformen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rab6 über das Motorprotein Rabkinesin-6 und seine Effektoren Bicaudal-1 und Bicaudal-2 den Transport von Vesikeln entlang von Mikrotubuli vermittelt (Echard *et al.*, 1998; Matanis *et al.*, 2002; Short *et al.*, 2002; Moorhead *et al.*, 2007). Für den Rab6-Effektor Bicaudal-1 konnte ebenfalls eine Assoziation mit der Inklusion aufgezeigt werden, was mögliche Interaktionen von Rab6 mit Chlamydien unterstützen würde (Moorhead *et al.*, 2007).

Die Wechselwirkung von Chlamydien mit diesen beiden Rab-Proteinen könnte einen Mechanismus zur Bereitstellung von Vesikeln aus dem Transportweg von den Endosomen zum TGN darstellen, während die Interaktion mit Rab-Proteinen aus der endosomalen/Recycling-Route (Rab4 und Rab11) die Fusion mit Transferrin beladenen Vesikeln fördert (van Ooij *et al.*, 1997; Al Younes *et al.*, 1999; Scidmore *et al.*, 2003). Die Wechselwirkung mit Rab-Proteinen aus dem sekretorischen Transport (Rab1, Rab6) hingegen dient der Bereitstellung von exozytotischen Vesikeln und Lipiden (Hackstadt *et al.*, 1995; Wolf und Hackstadt, 2001).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine Rab6 und Rab11 über das *Rab6 interacting protein1* (R6IP1) am TGN miteinander interagieren können (Miserey-Lenkei *et al.*, 2007). Der Komplex aus Rab6, R6IP1 und Rab11 ist in der Lage als Anker für Vesikel aus den frühen Endosomen zu dienen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl der funktionelle Ausfall von Rab6, als auch der von Rab11, einen nachteiligen Effekt auf die erfolgreiche Vermehrung der Chlamydien haben. Diese Beobachtung legen die Vermutung nahe, dass beide Rab-Proteine durch gegenseitige Wechselwirkung und die Ausbildung eines Komplexes an der Inklusionsmembran eine effiziente Vesikelrekrutierung ermöglichen könnten.



#### 4.2.2 Rab6- und Rab11-dekorierte Vesikel werden über spezifische Inc-Proteine an der Inklusionsmembran gebunden

Wie bereits erwähnt, konnte die Rekrutierung GFP-markierter Rab-Proteine zur Inklusionsmembran demonstriert werden, allerdings blieben die Mechanismen der Rekrutierung dieser Rab-Proteine bzw. Rab-positiver Vesikel an die Inklusionsmembran bislang unverstanden. Es ist nicht bekannt, ob Rab-Proteine in die Inklusionsmembran eingebaut werden. Es wird vermutet, dass die Bindung z.B. an ein noch nicht charakterisiertes Inc-Protein in der Inklusionsmembran erfolgen könnte. Einen vermeintlichen Partner bzw. SNARE für Rab11-markierte Vesikel stellt das Inc-Protein Cpn0585 aus *Cpn. pneumoniae* dar. In Hefe-2-Hybrid Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cpn0585 mit Rab1, Rab10, und Rab11, nicht aber mit Rab4 oder Rab6 interagieren kann und somit an der Rekrutierung von Rab-Proteinen bzw. Rab-positiven Vesikeln beteiligt sein könnte (Cortes *et al.*, 2007). Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass die ektopische Expression der Rab-Bindungsdomäne von Cpn0585, die Entwicklung der Inklusionen inhibierte (Cortes *et al.*, 2007). Dieser Effekt konnte durch Überexpression von Rab11 revertiert werden. Diese Ergebnisse sind konsistent zu den hier gezeigten elektronenmikroskopischen Daten der gestörten Entwicklung neuer infektiöser Partikel nach funktionellem Ausfall von Rab11. Zudem bestärken sie die Annahme, dass die Rekrutierung von Rab-Proteinen bzw. Rab-Protein-vermittelter Vesikeltransport zur Inklusion einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Vermehrung von Chlamydien hat.

In Immunfluoreszenzanalysen konnten Rzomp und Mitarbeiter außerdem zeigen, dass Rab11 partiell mit dem IncG-Protein aus *C. trachomatis* kolokalisiert und die GTPase Rab4 mit dem Inc-Protein CT229 interagiert (Rzomp *et al.*, 2003; Rzomp *et al.*, 2006).

Für Rab6 wurden allerdings bisher keine Interaktionen mit chlamydialen Inc-Proteinen beschrieben. Diese Untersuchungen demonstrieren, dass Bindungen von zellulären Rab-Proteinen an die Inklusion über Inc-Proteine möglich und wichtig sind. Sie bringen vesikuläre Transportgüter zur Inklusion und greifen vermutlich regulierend in die Fusionseigenschaften des Phagosoms ein.

### 4.2.3 Bedeutung von Rab-Proteinen für andere Pathogene

Diese Arbeit zeigte, dass die chlamydiale Vermehrung auf Wechselwirkungen mit spezifischen Rab-Proteinen angewiesen ist. Aber auch für andere intrazelluläre Pathogene haben Interaktionen mit bestimmten Rab-Proteinen eine große Bedeutung für ihr Überleben in der Zelle. Die Interaktionen unterscheiden sich teilweise stark von denen der Chlamydien. Die meisten von Makrophagen phagozytierten Organismen werden durch schnellen Transport von hydrolytischen Enzymen in das Phagosom eliminiert. Durch die gezielte Manipulation der zellulären Rab-Proteinfunktionen sind intrazelluläre Pathogene in der Lage, sowohl dem Transport zu Lysosomen und einer dortigen Degradation zu entkommen, als auch Faktoren für eine produktive Vermehrung abzufangen.

So wurden z.B. für *Mycobacterium tuberculosis* Interaktionen mit Rab5-abhängigen Transportwegen beschrieben. Durch die Blockade der Phagosomenmaturation im frühen, Rab5-positiven Stadium entgeht *Mycobacterium tuberculosis* der Degradation in Lysosomen. Des Weiteren erleichtert Rab5 die Versorgung mit Eisen (Kelley und Schorey, 2003). Zusätzlich konnten den Rab-Proteinen Rab22a und Rab14 eine Rolle in der Hemmung der Phagosomenreifung zugeordnet werden (Roberts *et al.*, 2006; Kyei *et al.*, 2006).

Auch die Reifung von *Salmonella enterica* ist durch Wechselwirkungen mit Rab-Proteinen reguliert. In einer Rastersuche mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium wurden 48 Rab-Proteine auf ihre Lokalisation getestet. 18 Rab-Proteine konnten an der Phagosomenmembran identifiziert werden, darunter die endozytotischen Regulatoren Rab5A, -5B, -5C, -7A, -11A, und -11B (Smith *et al.*, 2007). Zunächst interagiert die Salmonellen-beinhaltende Vakuole mit Rab5 und Rab4 und zu späteren Zeitpunkten mit den späten Endosomenmarkern Rab7 und Rab9, allerdings erfolgt keine Degradation in Lysosomen.

*Legionella pneumophila* hingegen fängt Vesikel aus dem exozytotischen Transport vom ER zum Golgi-Apparat ab (Kagan und Roy, 2002). Untersuchungen zeigten eine Rekrutierung der GTPasen Rab1 und ARF1 (*ADP ribosylation factor-1*) zur Phagosomenmembran. Rab1 ist am Transport und der Fusion von Vesikeln aus dem ER mit dem ERGIC und cis-Golgi-Apparat Kompartimenten beteiligt (Allan *et al.*, 2000; Moyer *et al.*, 2001). Über das Typ IV-Sekretionssystem von *Legionella pneumophila* wird der Guanin-Austauschfaktor (GEF) DrrA

sekretiert, der zur Aktivierung von Rab1 an der Membran führt (Murata *et al.*, 2006; Machner und Isberg, 2006).

Diese Untersuchungen zeigen sehr deutlich, dass das Spezifitätsspektrum, in dem intrazelluläre Pathogene über Rab-Proteine mit der Wirtszelle kommunizieren und interagieren sehr breit ist. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Pathogenen wurde interessanterweise in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss von Rab5 und Rab4 auf die Entwicklung der Chlamydien in Epithelzelllinien beobachtet. Welche Bedeutung Rab5 und Rab4 in Chlamydien-infizierten Makrophagen besitzen, bedarf weiterer Untersuchungen. Für Rab6 wurden erstaunlicherweise bisher keine weiteren Interaktionen mit anderen obligat intrazellulären Pathogenen, außer Chlamydien, beschrieben. Diese Daten lassen vermuten, dass die Wechselwirkung mit diesem Rab-Protein auf einen Chlamydien-spezifischen Mechanismus zurück zu führen ist. Die Bestätigung bedarf allerdings weiterer Analysen. Darüber hinaus könnte die Verwendung des hier beschriebenen experimentellen Aufbaus eine Analyse zur Relevanz spezieller Rab-Proteine für die bakterielle Entwicklung in weiteren Pathogenen ermöglichen.

#### **4.3 Funktioneller Ausfall von Rab6 und Rab11 verhindert die Golgin-84-abhängige Fragmentierung des Golgi-Apparates**

Im Gegensatz zur Fragmentierung des Golgi-Apparates durch eine chlamydiale Infektion oder den Verlust von Golginen, hatte der funktionelle Ausfall von Rab6 oder Rab11 in dieser Arbeit einen gegenteiligen Effekt auf die Golgi-Struktur in infizierten Zellen. Trotz Infektion wurde keine Fragmentierung und Umverteilung von Golgi-positiven Elementen um die Inklusion beobachtet. Untersuchungen von Rab6 in der Zellteilung demonstrierten, dass der Verlust von Rab6 keinen Effekt auf die Morphologie des Golgi-Apparates hatte, was konsistent zu den beobachteten Ergebnissen dieser Arbeit ist (Del Nery *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007).

Entsprechend der Blockierung der Chlamydien-förderlichen Fragmentierung des Golgi-Apparates hatte der Verlust dieser Rab-Proteine einen negativen Einfluss auf die bakterielle Replikation. Die Infektivität sank auf die Hälfte im Vergleich zu einer normalen Infektion, während der Verlust von Golgi-assoziierten Proteinen durch Fragmentierung eine Erhöhung der Infektivität begünstigte. Für die Golgi-Apparat-Homöostase sind beide Transportwege

von entscheidender Bedeutung: Rab6 vermittelt den retrograden Transport zum ER, als auch den intra-Golgi-Transport, während z.B. p115 im anterograden Transport agiert. Die Balance beider Routen sichert die Integrität des Golgi-Bandes. Durch den funktionellen Ausfall von Rab6 und Rab11 wird das Gleichgewicht des Golgi-Apparates zwischen Adhärenz und Fragmentierung in Richtung der Stabilität des Golgi-Apparates verschoben. Der Verlust von Golgin-84, Giantin, oder p115 hingegen wirkt in Richtung der Fragmentierung, was mit der Tatsache übereinstimmt, dass diese Proteine eine strukturbildende Funktion besitzen. Funktionelles Rab6- und Rab11-Protein wären hingegen für eine Fragmentierung des Golgi-Apparates erforderlich.

Wie bereits beschrieben, induziert die Infektion mit *C. trachomatis* die proteolytische Spaltung des Golgins Golgin-84 und den Zerfall des Golgi-Apparates (Heuer *et al.*, 2008). Die Analyse in Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen ergab keinen Einfluss des funktionellen Ausfalls von Rab6 oder Rab11 auf das Spaltmuster des Golgins. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Spaltung von Golgin-84 Rab6- bzw. Rab11-unabhängig erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden desweiteren die Auswirkungen einer simultanen Herunterregulation infektivitätsfördernder und -hemmender Faktoren auf die Golgi-Struktur und die bakterielle Entwicklung untersucht. Dazu wurden stabile Rab6- und Rab11-*knock down* Zelllinien verwendet, die mittels siRNA-Behandlung zusätzlich entweder Golgin-84 oder p115 herunterregulierten. Die Ergebnisse zeigten zwei unterschiedliche Phänotypen. Im simultanen *knock down* von Rab6 oder Rab11 mit Golgin-84 kam es zu keiner Golgi-Fragmentierung. Einheitlich dazu war die Infektivität vergleichbar zu einer normalen Infektion. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Rab6 und Rab11 an der Regulation der Golgin-84-induzierten Golgi-Fragmentierung beteiligt sein könnten. Da Golgin-84 unter anderem die kleine GTPase Rab1 bindet, wäre durchaus anzunehmen, dass Golgin-84 auch mit anderen Rab-Proteinen, wie z.B. Rab11 und Rab6, Wechselwirkungen eingehen könnte (Diao *et al.*, 2003). Die Beteiligung von Rab-Proteinen an der direkten Lokalisierung von Golginen konnte erst kürzlich demonstriert werden (Burguete *et al.*, 2008). Im speziellen wurde gezeigt, dass Rab6 das Golgin GCC185 zum TGN rekrutiert. Die Kristallstruktur offenbarte die Verankerung von Rab6 mittels der Geranylgeranyl-Gruppen am Golgi-Apparat. Der Lipidanker erreichte dabei die erstaunliche Reichweite von bis zu 10 nm. Durch Ausbildung eines hetero-hexamerschen Komplexes mit einer weiteren GTPase, Arl1, entstand eine stabile Plattform für die Lokalisierung von GCC185 zum TGN und ermöglichte

eine Funktion als Anker für ankommende Vesikel. Diese Struktur könnte auch einen möglichen Mechanismus der Rab-Protein-vermittelten Vesikelbindung an der Golgi-Membran darstellen. Rab6- oder Rab11-dekorierte Vesikel würden über Golgin-84 zum Golgi-Apparat rekrutiert werden und über SNARE-Paarungen eine Fusion der Vesikel einleiten. Der Verlust von Golgin-84 durch RNAi entzieht den Rab-Protein-markierten Vesikeln ihren Bindungspartner und resultiert in der Akkumulation von Vesikeln und dem Auflösen der Struktur.

Der Doppel-*knock down* mit p115 hingegen lieferte den entgegengesetzten Phänotyp. In der Immunfluoreszenz konnte eindeutig ein fragmentierter Golgi-Apparat nachgewiesen werden und auch die chlamydiale Infektivität war erhöht. Die Erhöhung war vergleichbar mit dem Einzel-*knock down* von p115. Die p115-induzierte Fragmentierung des Golgi-Apparates konnte nicht durch den funktionellen Ausfall von Rab6 oder Rab11 verhindert werden, was konsistent zu den Beobachtungen von Sun und Mitarbeitern ist (Sun *et al.*, 2007). Darüberhinaus war die Erhöhung der chlamydialen Infektivität im simultanen *knock down* von Rab6 oder Rab11 und p115 im Vergleich zum alleinigen p115 *knock down* nicht beeinträchtigt. Zurzeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass p115 einen Rab6- und Rab11-unabhängigen Mechanismus der Golgi-Fragmentierung darstellt.

#### **4.4 Rab-Proteine sind entscheidend für den Transport von Sphingolipiden in die Inklusion**

Für die effiziente Entwicklung der Bakterien, die Aufrechterhaltung und das Wachstum der Inklusion, rekrutieren Chlamydien Sphingolipide aus dem Golgi-Apparat der Wirtszelle zur Inklusion (Hackstadt *et al.*, 1995; Hackstadt *et al.*, 1996). Sphingolipide kommen in allen Eukaryonten vor, allerdings in nur wenigen Bakterien. Genomanalysen zeigten, dass Chlamydien Gene mit hoher Homologie zu denen besitzen, die für die Synthese von Lipiden, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin in anderen Organismen verantwortlich sind (Wylie *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998). Allerdings sind sie nicht in der Lage, Sphingomyelin selbstständig zu synthetisieren, das immerhin 4% der chlamydialen Lipide ausmacht (Newhall, 1988).

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte mikroskopische Untersuchungen zum Lipidtransport in lebenden Zellen zeigten eine deutliche Färbung der Bakterien innerhalb der

Inklusion von stabil transduzierten Luciferase-Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Ceramid. Diese Untersuchungen sind konsistent zu den veröffentlichten Daten des Sphingolipidtransportes in die Bakterien (Hackstadt *et al.*, 1995; Hackstadt *et al.*, 1996).

Wie die Lipide zur Inklusion und schließlich in die Bakterien gelangen, ist bisher nicht bekannt. Einerseits könnte die Versorgung durch vesikulären Transport erfolgen, andererseits könnten Lipid-Transferproteine, wie z.B. CERT (*ceramide transfer protein*) einen nicht-vesikulären Lipidtransport vermitteln (Lipsky und Pagano, 1985; Futerman *et al.*, 1990; Hanada *et al.*, 2003). CERT ist für den Transport von im ER synthetisierten Ceramiden zum Golgi-Apparat verantwortlich (Hanada *et al.*, 2003). Die CERT PH-Domäne (*pleckstrin homology*) und das FFAT Motiv (*two phenylalanines in an acidic tract*) binden in der aktivierten Form an Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PI4P) im Golgi-Apparat und an VAP (*vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein*) im ER. Durch schwingen der sogenannten START Domäne (*steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain*), die eine Ceramid-Transfer-Aktivität besitzt, können Lipide vom ER zum trans-Golgi transferiert werden (Hanada *et al.*, 2003). CERT vermittelt allerdings nicht den Transfer von Sphingosin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, oder Cholesterol (Kumagai *et al.*, 2005). Dafür sind andere Lipid-Transferproteine wie z.B. OSBP (*oxysterol binding protein*), Phosphoinositol-Transferproteine (PITP) oder FAPP2 verantwortlich (Wirtz, 1991; Godi *et al.*, 2004; Im *et al.*, 2005; Raychaudhuri *et al.*, 2006; Perry und Ridgway, 2006).

Das Auflösen der Golgi-Struktur könnte die Kontaktflächen der Membranen für CERT an der Inklusion vergrößern, was einen gesteigerten nicht-vesikulären Lipidtransfer in die Inklusion zur Folge hätte. Die Fragmentierung des Golgi-Apparates und das Anlegen von Golgi-Zisternen an die Inklusion könnten aber auch den Vesikeltransport durch Oberflächenvergrößerung erhöhen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen zum Proteintransport in ungestapelten Zisternen (Wang *et al.*, 2008). Im Golgi-Stapel können sich Vesikel nur am Rand der Zisternen bilden. Unterbindet man hingegen die Stapelausbildung durch Injektion von Antikörpern gegen GRASP65 oder durch eine dominant-aktive Mutante, so können sich mehrere Vesikel, durch die vergrößerte Oberfläche, effizienter abschnüren und den Proteintransport zur Plasmamembran erhöhen. Anhand mikroskopischer Analysen wurde die Bedeutung der Blockierung der Golgi-Fragmentierung auf den Transport von Lipiden zur Inklusionsmembran untersucht. Echtzeit-Aufnahmen lebender Rab6- und Rab11-*knock down* Zellen zeigten eine Anreicherung von

markiertem Ceramid im Golgi-Apparat. Im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen fand allerdings kein Transport über die Inklusionsmembran zu den Bakterien statt.

Einerseits könnte diese Beobachtung auf die verhinderte Golgi-Fragmentierung zurückzuführen sein. Die Membranoberfläche würde dadurch nicht vergrößert werden und der bereits beschriebene gesteigerte Transfer von Lipiden zwischen der Golgi-Membran und der Inklusionsmembran könnte nicht stattfinden. Eine hinreichende Versorgung der Bakterien mit Lipiden wäre in diesem Fall nicht gewährleistet, was die beobachtete verminderte Ausbildung infektiöser Partikel zur Folge hätte.

Andererseits könnte der vesikuläre Lipidtransport in den Rab6- oder Rab11-*knock down* Zellen gestört sein. Dass ein Rab-Protein-regulierter vesikulärer Lipidtransport denkbar ist, zeigten Untersuchungen zur Beteiligung von Rab-Proteinen am Transport von Cholesterol innerhalb der Zelle. Die Cholesterol-Aufnahme über z.B. den LDL-Rezeptorweg (*low density lipoprotein*) und die Speicherung in der Zelle sind streng überwacht. Störungen in der Freisetzung führten zu einer abnormen Ansammlung von Cholesterol in endosomalen Organellen und resultierten in der vererbten Stoffwechselerkrankung Niemann-Pick Typ C Syndrom (NP-C) (Pentchev *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2005). Die hierbei beobachtete hohe Akkumulation von Cholesterol in der Zelle konnte durch die Überexpression von Rab7 und Rab9 wieder aufgelöst werden (Choudhury *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2003). Rab8 konnte zudem eine Rolle in der Beseitigung von Cholesterol aus endosomalen Organellen zugewiesen werden (Linder *et al.*, 2007). Cholesterol wird auf seinem Transportweg innerhalb der Zelle zum ER gebracht, wo es über das Enzym ACAT (Acyl-Coenzym A-Cholesterol Acyltransferase) verestert und in Lipidtröpfchen gespeichert wird (Mukherjee *et al.*, 1958; Goodman *et al.*, 1964; Brown *et al.*, 1980). Rab11 ist für die Aufnahme und den Transport von Cholesterol zu den Recycling-Endosomen zuständig (Holttä-Vuori *et al.*, 2002). Bei Überexpression von Rab11 kam es zu einer Rückhaltung von Cholesterol in Recycling-Endosomen durch Störung des Transportes zurück an die Plasmamembran und einer Hemmung der Veresterung. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Expression von Rab6 die Cholesterolveresterung in Zellen, die in Lipoprotein-defizienten Serum kultiviert wurden, steigerte. Der Rab6-regulierte retrograde Transport würde Cholesterol zum ER bringen, wo ACAT seine Funktion ausführen könnte (Holttä-Vuori *et al.*, 2002).

Die Aufnahme von Cholesterol ist für den Aufbau der Chlamydien-Zellwand notwendig (Carabeo *et al.*, 2003). Dabei sind die Bakterien in der Lage sowohl *de novo*-synthetisiertes,



als auch über LDL aufgenommenes Cholesterol der Wirtszelle zu benutzen. Es wäre denkbar, dass Rab6- und Rab11-positive Vesikel Cholesterol, Sphingolipide und andere Lipide zur Inklusionsmembran transportieren, die als Rohstofflager für den Aufbau von neuen Membranen dienen. Der Verlust der untersuchten Proteine Rab6 und Rab11 könnte durch Blockade der Golgi-Fragmentierung zu einem Rückhalten der Lipide im Golgi-Apparat und somit einer Störung des Transportes in die Inklusion führen. Die resultierende Unterversorgung mit notwendigen Lipiden würde die beobachtete Entwicklungsstörung der Bakterien in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erklären.

#### **4.5 Modell zur Regulation der Chlamydien-induzierten Golgi-Fragmentierung durch Rab-Proteine**

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in folgendes Modell einordnen (Abb. 4.1):

Am TGN des Golgi-Apparates werden nicht nur Rab6- und Rab11-dekorierte Vesikel aus der endosomalen Route verankert, sondern können auch abgeschnürt werden. Die Balance zwischen austretendem und ankommendem Transportgut, wird durch retrograden, Rab-Protein-vermittelten Vesikeltransport gewährleistet. Dabei binden Rab6- und Rab11-Vesikel an das volle Länge cis-Golgi-Protein Golgin-84.

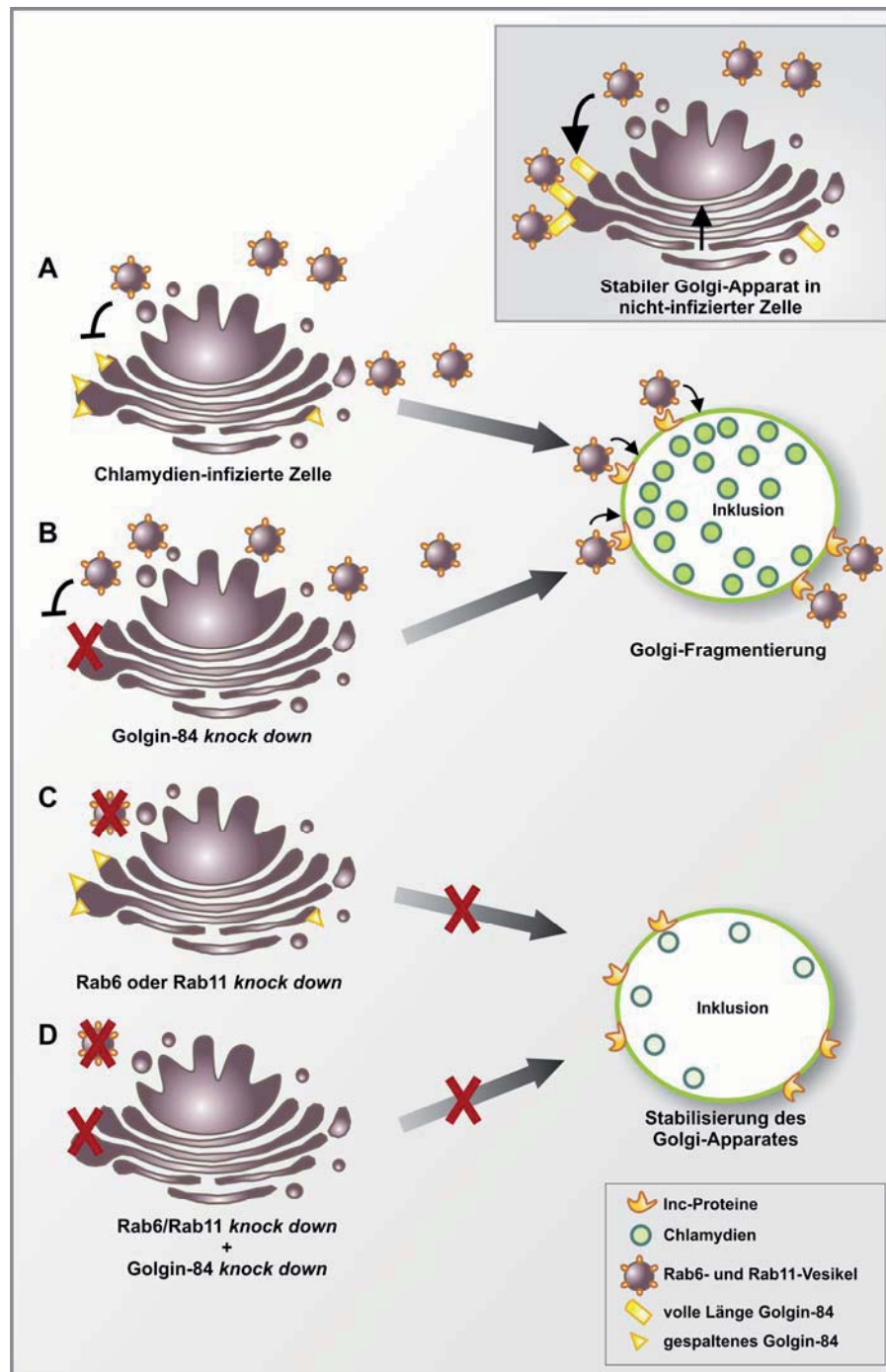
Eine Infektion mit Chlamydien induziert die Fragmentierung des Golgi-Apparates durch Spaltung des Strukturproteins Golgins-84. An gespaltenes Golgin-84 können Rab6- und Rab11-dekorierte Vesikel nicht binden und verlieren dadurch ihren Bindungspartner am cis-Golgi. Diese Vesikel werden nun an die Inklusionsmembran geführt, wo sie vermutlich an Inc-Proteine binden und ihr Transportgut und Lipide in die Inklusion entlassen.

Ein ähnliches Szenario erfolgt bei der Herunterregulation von Golgin-84. Der Verlust entzieht Rab6- und Rab11-Vesikeln den Bindungspartner. Bereits zum Zeitpunkt der Infektion liegen eine Vielzahl von vesikulären Golgi-Strukturen in der Zelle vor, die zur Inklusion rekrutiert werden können. Die Vergrößerung der Oberfläche der Golgi-Membranen (Vesikeln) an der Inklusionsmembran erlaubt die effiziente und schnelle Übertragung von wichtigen Nährstoffen zu den Bakterien; die Infektivität steigt.

Im Gegensatz dazu blockiert der Verlust von Rab6 oder Rab11 und der simulante Verlust von Rab-Proteinen und Golgin-84 die Golgi-Fragmentierung. Unter diesen Umständen können Golgi-abgeleitete Rab-Vesikel nicht mehr gebildet werden. Der damit verbundene Verlust



von Rab-positiven Vesikeln an der Inklusionsmembran resultiert in einer Unterversorgung der Bakterien mit wichtigen Sphingolipiden und anderen Nährstoffen und führt zu einer gestörten Replikation der Chlamydien.



**Abb.4.1 Modell zur Rolle von Rab6, Rab11 und Golgin-84 auf die Golgi-Morphologie und die chlamydiale Entwicklung**

(A, B) Chlamydien induzieren eine Fragmentierung des Golgi-Apparates durch Spaltung von Golgin-84. Durch Blockierung der Bindung an gespaltenes Golgin-84, bzw. bei Verlust von Golgin-84, akkumulieren Rab6- und Rab11-Vesikel und werden zur Inklusion rekrutiert. Dieses hat einen positiven Effekt auf die bakterielle Vermehrung. (C, D) Der funktionelle Ausfall von Rab6 oder Rab11, bzw. die simultane Herunterregulation von Rab6 oder Rab11 und Golgin-84 stabilisiert die Golgi-Struktur durch ausbleibende Vesikelbildung. Der Transport dieser Vesikel zur Inklusion bleibt aus; die Infektivität sinkt.

## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Auswirkungen des Verlustes von spezifischen Wirtszellproteinen auf die Entwicklung von Chlamydien. Die hier untersuchte Abhängigkeit der chlamydialen Vermehrungsrate mit der Rab6- und Rab11-vermittelten Strukturänderung des Golgi-Apparates, sind ein weiterer Schritt hin zu einem tieferen Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktionen.

Ein großes Problem in der Behandlung von Chlamydien-Infektionen mit Antibiotika ist der mögliche Eintritt des Bakteriums in ein persistentes Stadium, indem es überlebensfähig bleibt und nach Beenden der Therapie wieder in eine akute Infektion münden kann. Da Chlamydien zurzeit nicht genetisch manipuliert werden können, bietet die RNA-Interferenz eine gute Möglichkeit neue zelluläre Faktoren zu identifizieren, welche die chlamydiale Entwicklung und Vermehrung wirkungsvoll schädigen. Die Blockierung der Golgi-Fragmentierung durch funktionellen Ausfall von Rab6 und Rab11 könnte als anti-chlamydialer Mechanismus genutzt werden, um eine Infektion und das Risiko einer Chlamydien-assoziierten Erkrankung zu mindern. In Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen könnten zusätzlich spezifische Bindungspaarungen zwischen Wirt und Pathogen aufgedeckt werden, die für eine effiziente Versorgung der Inklusion mit nährstoffreichen Vesikeln verantwortlich sind. Deren funktionelles Ausschalten könnte einen Vorteil für die gezielte Behandlung bieten. Eine interessante Aufgabe für weiterführende Experimente wäre somit die Identifizierung möglicher Rezeptoren oder SNAREs auf der Oberfläche der Inklusion für die Bindung ankommender Rab-Protein-markierter Vesikel. Eine putative Rolle von IncG und Cpn0585 als Bindungspartner für Rab11-Vesikel sollte unbedingt eingehender untersucht werden.

In dieser Arbeit konnten nicht nur direkte Einflüsse auf die Chlamydien demonstriert werden, sondern auch neue Erkenntnisse zur Funktion des Golgi-Apparates gewonnen werden. Die Erforschung der strukturellen Integrität des Golgi-Apparates und die Aufklärung der Mechanismen zur Zerlegung des Golgi-Apparates sind von hohem klinischen Interesse. In Patienten mit der neurodegenerativen Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wurden fragmentierte Golgi-Apparate in den geschädigten Motoneuronen nachgewiesen (Mourelatos *et al.*, 1990; Gonatas *et al.*, 2006). Ähnliche Läsionen wurden außerdem auch in der Alzheimer-Krankheit und Creutzfeldt-Jacob-Krankheit beobachtet (Stieber *et al.*, 1996;

Sakurai *et al.*, 2000). Die Verhinderung der Golgi-Fragmentierung durch spezifisches Ausschalten von zellulären Rab-Proteinen, wie z.B. Rab6 und Rab11 könnte zu neuen Therapieansätzen bei der Behandlung dieser Krankheiten führen.

Die Lipid-Untersuchungen in Chlamydien-infizierten Zellen unterstrichen zudem die Bedeutung des Transportes und der Transfermechanismen von Lipiden und Sphingolipidvorläufern, wie Ceramiden, durch die Inklusionsmembran zu den Bakterien. Eine Aufklärung dieser Wege könnte zur Entwicklung neuer anti-chlamydialer Lipid-Derivate beitragen. Diese therapeutischen Agenzien könnten gezielt die Inklusion erfassen, in bzw. an dieser akkumulieren und den Sphingolipid-Transport und Metabolismus effektiv stören. Die Schädigung der chlamydialen Replikation und des Wachstum würden eine kontrollierte Behandlung der Infektion ermöglichen.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht nur neue Erkenntnisse im Verständnis und der Therapie von Chlamydien-Infektionen und Chlamydien-assoziierten Krankheiten, sondern können auch zu neuen Einsichten in der Strategie einer erfolgreichen Vermehrung anderer intrazellulärer Pathogene beitragen.

## V. LITERATURVERZEICHNIS

- Al Younes, H.M., T.Rudel, V.Brinkmann, A.J.Szczepek und T.F.Meyer. 2001. Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol.* 3:427-437.
- Al Younes, H.M., T.Rudel und T.F.Meyer. 1999. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing Chlamydia pneumoniae in human epithelial cells. *Cell Microbiol.* 1:237-247.
- Allan, B.B., B.D.Moyer und W.E.Balch. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289:444-448.
- Allison, A.C. und P.Davies. 1974. Mechanisms of endocytosis and exocytosis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 419-446.
- Amann, R., N.Springer, W.Schonhuber, W.Ludwig, E.N.Schmid, K.D.Muller und R.Michel. 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:115-121.
- Antonny, B., D.Madden, S.Hamamoto, L.Orci und R.Schekman. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat. Cell Biol.* 3:531-537.
- Antony, C., C.Cibert, G.Geraud, M.A.Santa, B.Maró, V.Mayau und B.Goud. 1992. The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 3):785-796.
- Bannantine, J.P. und D.D.Rockey. 1999. Use of primate model system to identify Chlamydia trachomatis protein antigens recognized uniquely in the context of infection. *Microbiology* 145 ( Pt 8):2077-2085.
- Bannantine, J.P., W.E.Stamm, R.J.Suchland und D.D.Rockey. 1998. Chlamydia trachomatis IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates. *Infect. Immun.* 66:6017-6021.
- Barlowe, C., L.Orci, T.Yeung, M.Hosobuchi, S.Hamamoto, N.Salama, M.F.Rexach, M.Ravazzola, M.Amherdt und R.Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77:895-907.
- Barlowe, C. und R.Schekman. 1993. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365:347-349.
- Barr, F.A., M.Puype, J.Vandekerckhove und G.Warren. 1997. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* 91:253-262.
- Barr, F.A. und B.Short. 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:405-413.
- Barr, F.A. und G.Warren. 1996. Disassembly and reassembly of the Golgi apparatus. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 7:505-510.
- Beard, M., A.Satoh, J.Shorter und G.Warren. 2005. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J. Biol. Chem.* 280:25840-25848.

- Beatty, W.L., G.I.Byrne und R.P.Morrison. 1993. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:3998-4002.
- Beatty, W.L., R.P.Morrison und G.I.Byrne. 1994. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 58:686-699.
- Belland, R.J., S.P.Ouellette, J.Gieffers und G.I.Byrne. 2004. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol.* 6:117-127.
- Beznoussenko, G.V. und A.A.Mironov. 2002. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *Anat. Rec.* 268:226-238.
- Bock, J.B., H.T.Matern, A.A.Peden und R.H.Scheller. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409:839-841.
- Bonfanti, L., A.A.Mironov, Jr., J.A.Martinez-Menarguez, O.Martella, A.Fusella, M.Baldassarre, R.Buccione, H.J.Geuze, A.A.Mironov und A.Luini. 1998. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95:993-1003.
- Borel, N., R.Thoma, P.Spaeni, R.Weilenmann, K.Teankum, E.Brugnera, D.R.Zimmermann, L.Vaughan und A.Pospischil. 2006. *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. *Vet. Pathol.* 43:702-708.
- Brown, M.S., Y.K.Ho und J.L.Goldstein. 1980. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 255:9344-9352.
- Burguete, A.S., T.D.Fenn, A.T.Brunger und S.R.Pfeffer. 2008. Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* 132:286-298.
- Bush, R.M. und K.D.Everett. 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:203-220.
- Carabeo, R.A., D.J.Mead und T.Hackstadt. 2003. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *PNAS* 100:6771-6776.
- Chang, T.Y., C.C.Chang, N.Ohgami und Y.Yamauchi. 2006. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:129-157.
- Chen, F.W., R.E.Gordon und Y.A.Ioannou. 2005. NPC1 late endosomes contain elevated levels of non-esterified ('free') fatty acids and an abnormally glycosylated form of the NPC2 protein. *Biochem. J.* 390:549-561.
- Choudhury, A., M.Dominguez, V.Puri, D.K.Sharma, K.Narita, C.L.Wheatley, D.L.Marks und R.E.Pagano. 2002. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Invest* 109:1541-1550.
- Clifton, D.R., C.A.Dooley, S.S.Grieshaber, R.A.Carabeo, K.A.Fields und T.Hackstadt. 2005. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect. Immun.* 73:3860-3868.

- Clifton, D.R., K.A.Fields, S.S.Grieshaber, C.A.Dooley, E.R.Fischer, D.J.Mead, R.A.Carabeo und T.Hackstadt. 2004. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:10166-10171.
- Cluett, E.B. und W.J.Brown. 1992. Adhesion of Golgi cisternae by proteinaceous interactions: intercisternal bridges as putative adhesive structures. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 3):773-784.
- Cole, N.B., N.Sciaky, A.Marotta, J.Song und J.Lippincott-Schwartz. 1996. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* 7:631-650.
- Cortes, C., K.A.Rzomp, A.Tvinnereim, M.A.Scidmore und B.Wizel. 2007. Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases. *Infect. Immun.* 75:5586-5596.
- Crowther, R.A. und B.M.Pearse. 1981. Assembly and packing of clathrin into coats. *J. Cell Biol.* 91:790-797.
- Cuif, M.H., F.Possmayer, H.Zander, N.Bordes, F.Jollivet, Couedel-Court, I.Janoueix-Lerosey, G.Langsley, M.Bornens und B.Goud. 1999. Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* 18:1772-1782.
- Del Nery, E., S.Miserey-Lenkei, T.Falguieres, C.Nizak, L.Johannes, F.Perez und B.Goud. 2006. Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic.* 7:394-407.
- Delevoye, C., M.Nilges, A.Dautry-Varsat und A.Subtil. 2004. Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes. *J. Biol. Chem.* 279:46896-46906.
- Delevoye, C.+, M.Nilges, P.Dehoux, F.Paumet, S.p.Perrinet, A.Dautry-Varsat und A.Subtil. 2008. SNARE Protein Mimicry by an Intracellular Bacterium. *PLoS Pathog* 4:e1000022.
- Diao, A., D.Rahman, D.J.Pappin, J.Lucocq und M.Lowe. 2003. The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. *J. Cell Biol.* 160:201-212.
- Dirac-Svejstrup, A.B., T.Sumizawa und S.R.Pfeffer. 1997. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* 16:465-472.
- Echard, A., F.Jollivet, O.Martinez, J.J.Lacapere, A.Rousselet, I.Janoueix-Lerosey und B.Goud. 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279:580-585.
- Echard, A., F.J.Opdam, H.J.de Leeuw, F.Jollivet, P.Savelkoul, W.Hendriks, J.Voorberg, B.Goud und J.A.Fransen. 2000. Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol. Biol. Cell* 11:3819-3833.
- Elbashir, S.M., J.Harborth, W.Lendeckel, A.Yalcin, K.Weber und T.Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
- Elbashir, S.M., W.Lendeckel und T.Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Elsner, M., H.Hashimoto und T.Nilsson. 2003. Cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon! (Review). *Mol. Membr. Biol.* 20:221-229.



- Elwell, C. und J.N.Engel. 2005. *Drosophila melanogaster* S2 cells: a model system to study Chlamydia interaction with host cells. *Cell Microbiol.* 7:725-739.
- Elwell, C.A., A.Ceesay, J.H.Kim, D.Kalman und J.N.Engel. 2008. RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in Chlamydia trachomatis entry. *PLoS. Pathog.* 4:e1000021.
- Everett, K.D., R.M.Bush und A.A.Andersen. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2:415-440.
- Faro, S. 1985. Chlamydia trachomatis infection in women. *J. Reprod. Med.* 30:273-278.
- Farquhar, M.G. und G.E.Palade. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8:2-10.
- Fasshauer, D., H.Otto, W.K.Eliason, R.Jahn und A.T.Brunger. 1997. Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* 272:28036-28041.
- Fire, A., S.Xu, M.K.Montgomery, S.A.Kostas, S.E.Driver und C.C.Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Ford, M.G.J., I.G.Mills, B.J.Peter, Y.Vallis, G.J.K.Praefcke, P.R.Evans und H.T.McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419:361-366.
- Friis, R.R. 1972. Interaction of L cells and Chlamydia psittaci: entry of the parasite and host responses to its development. *J. Bacteriol.* 110:706-721.
- Fritsche, T.R., M.Horn, M.Wagner, R.P.Herwig, K.H.Schleifer und R.K.Gautam. 2000. Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2613-2619.
- Fukui, K., T.Sasaki, K.Imazumi, Y.Matsuura, H.Nakanishi und Y.Takai. 1997. Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272:4655-4658.
- Futerman, A.H. und H.Riezman. 2005. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15:312-318.
- Futerman, A.H., B.Stieger, A.L.Hubbard und R.E.Pagano. 1990. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 265:8650-8657.
- Gambhir, M., M.G.Basanez, F.Turner, J.Kumaresan und N.C.Grassly. 2007. Trachoma: transmission, infection, and control. *Lancet Infect. Dis.* 7:420-427.
- Gillingham, A.K. und S.Munro. 2003. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 1641:71-85.
- Godi, A., A.Di Campli, A.Konstantakopoulos, G.Di Tullio, D.R.Alessi, G.S.Kular, T.Daniele, P.Marra, J.M.Lucocq und M.A.De Matteis. 2004. FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* 6:393-404.

- Gonatas, N.K., A.Stieber und J.O.Gonatas. 2006. Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J. Neurol. Sci.* 246:21-30.
- Goodman, D.S., D.Deykin und T.Shiratori. 1964. The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. *J. Biol. Chem.* 239:1335-1345.
- Goud, B., A.Zahraoui, A.Tavitian und J.Saraste. 1990. Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345:553-556.
- Grasse, P.P. 1957. [Ultrastructure, polarity and reproduction of Golgi apparatus.]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 245:1278-1281.
- Grayston, J.T. 2000. Background and current knowledge of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *J. Infect. Dis.* 181 Suppl 3:S402-S410.
- Grieshaber, S.S., N.A.Grieshaber und T.Hackstadt. 2003. Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J. Cell Sci.* 116:3793-3802.
- Griffiths, G. und K.Simons. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234:438-443.
- Grosshans, B.L., D.Ortiz und P.Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:11821-11827.
- Hackstadt, T., D.D.Rockey, R.A.Heinzen und M.A.Scidmore. 1996. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J.* 15:964-977.
- Hackstadt, T., M.A.Scidmore und D.D.Rockey. 1995. Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:4877-4881.
- Hackstadt, T., M.A.Scidmore-Carlson, E.I.Shaw und E.R.Fischer. 1999. The Chlamydia trachomatis IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol.* 1:119-130.
- Halberstaedter, L. und S.Von Prowazek. 1907. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 26:44-47.
- Hanada, K., K.Kumagai, S.Yasuda, Y.Miura, M.Kawano, M.Fukasawa und M.Nishijima. 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426:803-809.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hatch, G.M. und G.McClarty. 1998. Phospholipid composition of purified Chlamydia trachomatis mimics that of the eucaryotic host cell. *Infect. Immun.* 66:3727-3735.
- Hauri, H.P., F.Kappeler, H.Andersson und C.Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 4):587-596.
- Hauri, H.P. und A.Schweizer. 1992. The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:600-608.



- Heinzen, R.A., M.A.Scidmore, D.D.Rockey und T.Hackstadt. 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 64:796-809.
- Heuer, D., A.Rejman Lipinski, N.Machuy, A.Karlas, A.Wehtens, F.Siedler, V.Brinkmann und T.F.Meyer. 2008. *Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* akzeptiert.
- Hirokawa, N., R.Sato-Yoshitake, N.Kobayashi, K.K.Pfister, G.S.Bloom und S.T.Brady. 1991. Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* 114:295-302.
- Hodinka, R.L., C.H.Davis, J.Choong und P.B.Wyrick. 1988. Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect. Immun.* 56:1456-1463.
- Holtta-Vuori, M., K.Tanhuanpaa, W.Mobius, P.Somerharju und E.Ikonen. 2002. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 13:3107-3122.
- Horn, M., M.Wagner, K.D.Muller, E.N.Schmid, T.R.Fritsche, K.H.Schleifer und R.Michel. 2000. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* 146 ( Pt 5):1231-1239.
- Huesken, D., J.Lange, C.Mickanin, J.Weiler, F.Asselbergs, J.Warner, B.Meloon, S.Engel, A.Rosenberg, D.Cohen, M.Labow, M.Reinhardt, F.Natt und J.Hall. 2005. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* 23:995-1001.
- Hybiske, K. und R.S.Stephens. 2007a. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 75:3925-3934.
- Hybiske, K. und R.S.Stephens. 2007b. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:11430-11435.
- Hybiske, K. und R.S.Stephens. 2008. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat Rev Micro* 6:99-110.
- Im, Y.J., S.Raychaudhuri, W.A.Prinz und J.H.Hurley. 2005. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* 437:154-158.
- Jackson, A.L., S.R.Bartz, J.Schelter, S.V.Kobayashi, J.Burchard, M.Mao, B.Li, G.Cavet und P.S.Linsley. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21:635-637.
- Kagan, J.C. und C.R.Roy. 2002. Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Cell Biol.* 4:945-954.
- Kelley, V.A. und J.S.Schorey. 2003. Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron. *Mol. Biol. Cell* 14:3366-3377.
- Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64:315-343.
- Kumagai, K., S.Yasuda, K.Okemoto, M.Nishijima, S.Kobayashi und K.Hanada. 2005. CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* 280:6488-6495.
- Kyei, G.B., I.Vergne, J.Chua, E.Roberts, J.Harris, J.R.Junutula und V.Deretic. 2006. Rab14 is critical for maintenance of Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *EMBO J.* 25:5250-5259.

- Lesca, G.M., J.Seemann, J.Shorter, J.Vandekerckhove und G.Warren. 2000. The amino-terminal domain of the golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115. *J. Biol. Chem.* 275:2831-2836.
- Letourneur, F., E.C.Gaynor, S.Hennecke, C.Demolliere, R.Duden, S.D.Emr, H.Riezman und P.Cosson. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79:1199-1207.
- Linder, M.D., R.L.Uronen, M.Holtta-Vuori, P.van der Sluijs, J.Peranen und E.Ikonen. 2007. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell* 18:47-56.
- Lipsky, N.G. und R.E.Pagano. 1985. Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: endogenously synthesized sphingomyelin and glucocerebroside analogues pass through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 100:27-34.
- Losev, E., C.A.Reinke, J.Jellen, D.E.Strongin, B.J.Bevis und B.S.Glick. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441:1002-1006.
- Lowe, M., C.Rabouille, N.Nakamura, R.Watson, M.Jackman, E.Jamsa, D.Rahman, D.J.Pappin und G.Warren. 1998. Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* 94:783-793.
- Machner, M.P. und R.R.Isberg. 2006. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* 11:47-56.
- Machuy, N., B.Thiede, K.Rajalingam, C.Dimmler, O.Thieck, T.F.Meyer und T.Rudel. 2005. A Global Approach Combining Proteome Analysis and Phenotypic Screening with RNA Interference Yields Novel Apoptosis Regulators. *Mol Cell Proteomics* 4:44-55.
- Mallard, F., B.L.Tang, T.Galli, D.Tenza, A.Saint-Pol, X.Yue, C.Antony, W.Hong, B.Goud und L.Johannes. 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* 156:653-664.
- Mallik, R. und S.P.Gross. 2004. Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* 14:R971-R982.
- Malsam, J., A.Satoh, L.Pelletier und G.Warren. 2005. Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles. *Science* 307:1095-1098.
- Marra, P., L.Salvatore, A.Mironov, Jr., A.Di Campli, G.Di Tullio, A.Trucco, G.Beznoussenko, A.Mironov und M.A.De Matteis. 2007. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol. Biol. Cell* 18:1595-1608.
- Martinez-Menarguez, J.A., H.J.Geuze, J.W.Slot und J.Klumperman. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 98:81-90.
- Martinez-Menarguez, J.A., R.Prekeris, V.M.Oorschot, R.Scheller, J.W.Slot, H.J.Geuze und J.Klumperman. 2001. Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 155:1213-1224.

- Matanis, T., A.Akhmanova, P.Wulf, E.Del Nery, T.Weide, T.Stepanova, N.Galjart, F.Grosveld, B.Goud, C.I.De Zeeuw, A.Barnekow und C.C.Hoogenraad. 2002. Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat. Cell Biol.* 4:986-992.
- Mehta, S.J., R.D.Miller, J.A.Ramirez und J.T.Summersgill. 1998. Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism. *J. Infect. Dis.* 177:1326-1331.
- Mironov, A.A., G.V.Beznoussenko, P.Nicoziani, O.Martella, A.Trucco, H.S.Kweon, D.Di Giandomenico, R.S.Polishchuk, A.Fusella, P.Lupetti, E.G.Berger, W.J.Geerts, A.J.Koster, K.N.Burger und A.Luini. 2001. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell Biol.* 155:1225-1238.
- Miserey-Lenkei, S., F.Waharte, A.Boulet, M.H.Cuif, D.Tenza, A.El Marjou, G.Raposo, J.Salamero, L.Heliot, B.Goud und S.Monier. 2007. Rab6-interacting protein 1 links Rab6 and Rab11 function. *Traffic.* 8:1385-1403.
- Monier, S., F.Jollivet, I.Janoueix-Lerosey, L.Johannes und B.Goud. 2002. Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic.* 3:289-297.
- Moorhead, A.R., K.A.Rzomp und M.A.Scidmore. 2007. The Rab6 effector Bicaudal D1 associates with Chlamydia trachomatis inclusions in a biovar-specific manner. *Infect Immun.*
- Moulder, J.W. 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55:143-190.
- Mourelatos, Z., H.Adler, A.Hirano, H.Donnenfeld, J.O.Gonatas und N.K.Gonatas. 1990. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis revealed by organelle-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:4393-4395.
- Moyer, B.D., B.B.Allan und W.E.Balch. 2001. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic.* 2:268-276.
- Mukherjee, S., G.Kunitake und R.B.Alfinslater. 1958. The esterification of cholesterol with palmitic acid by rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 230:91-96.
- Munro, S. 2005. The Golgi apparatus: defining the identity of Golgi membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:395-401.
- Murata, T., A.Delprato, A.Ingmundson, D.K.Toomre, D.G.Lambright und C.R.Roy. 2006. The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell Biol.* 8:971-977.
- Nakamura, N., M.Lowe, T.P.Levine, C.Rabouille und G.Warren. 1997. The Vesicle Docking Protein p115 Binds GM130, a cis-Golgi Matrix Protein, in a Mitotically Regulated Manner. *Cell* 89:445-455.
- Newhall, W.J.1988. Macromolecular and antigenic composition of chlamydiae. *Microbiology of Chlamydia* 48-70.
- Nozawa, K., C.A.Casiano, J.C.Hamel, C.Molinaro, M.J.Fritzler und E.K.Chan. 2002. Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthritis Res.* 4:R3.

- Ojcus, D.M., R.Hellio und A.Dautry-Varsat. 1997. Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect. Immun.* 65:2437-2442.
- Orci, L., M.Stamnes, M.Ravazzola, M.Amherdt, A.Perrelet, T.H.Sollner und J.E.Rothman. 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90:335-349.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358.
- Paschal, B.M., H.S.Shpetner und R.B.Vallee. 1987. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* 105:1273-1282.
- Pelham, H.R. 1988. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* 7:913-918.
- Pelham, H.R. und J.E.Rothman. 2000. The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? *Cell* 102:713-719.
- Pentchev, P.G., R.O.Brady, E.J.Blanchette-Mackie, M.T.Vanier, E.D.Carstea, C.C.Parker, E.Goldin und C.F.Roff. 1994. The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1225:235-243.
- Pentchev, P.G., M.E.Comly, H.S.Kruth, M.T.Vanier, D.A.Wenger, S.Patel und R.O.Brady. 1985. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:8247-8251.
- Pepperkok, R., J.A.Whitney, M.Gomez und T.E.Kreis. 2000. COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 1):135-144.
- Pereira-Leal, J.B. und M.C.Seabra. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313:889-901.
- Perry, R.J. und N.D.Ridgway. 2006. Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol. Biol. Cell* 17:2604-2616.
- Peter, B.J., H.M.Kent, I.G.Mills, Y.Vallis, P.J.Butler, P.R.Evans und H.T.McMahon. 2004. BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* 303:495-499.
- Presley, J.F., N.B.Cole, T.A.Schroer, K.Hirschberg, K.J.M.Zaal und J.Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85.
- Puthenveedu, M.A., C.Bachert, S.Puri, F.Lanni und A.D.Linstedt. 2006. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat. Cell Biol.* 8:238-248.
- Raychaudhuri, S., Y.J.Im, J.H.Hurley und W.A.Prinz. 2006. Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* 173:107-119.
- Rejman Lipinski, A., Meissner, C., Meyer, T.F. und Heuer, D.Rab6 and Rab11 regulate chlamydia-induced Golgi fragmentation. *In Vorbereitung.*

- Reynolds, A., D.Leake, Q.Boese, S.Scaringe, W.S.Marshall und A.Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22:326-330.
- Robert Koch-Institut.2001. Epidemiologisches Bulletin. 14: 96-100.
- Roberts, E.A., J.Chua, G.B.Kyei und V.Deretic. 2006. Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 174:923-929.
- Rockey, D.D., R.A.Heinzen und T.Hackstadt. 1995. Cloning and characterization of a Chlamydia psittaci gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol.* 15:617-626.
- Rosing, M., E.Ossendorf, A.Rak und A.Barnekow. 2007. Giantin interacts with both the small GTPase Rab6 and Rab1. *Exp. Cell Res.* 313:2318-2325.
- Rothman, J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55-63.
- Rzomp, K.A., A.R.Moorhead und M.A.Scidmore. 2006. The GTPase Rab4 interacts with Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT229. *Infect. Immun.* 74:5362-5373.
- Rzomp, K.A., L.D.Scholtes, B.J.Briggs, G.R.Whittaker und M.A.Scidmore. 2003. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect. Immun.* 71:5855-5870.
- Saikku, P., M.Leinonen, K.Mattila, M.R.Ekman, M.S.Nieminen, P.H.Makela, J.K.Huttunen und V.Valtonen. 1988. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2:983-986.
- Sakurai, A., K.Okamoto, Y.Fujita, Y.Nakazato, K.Wakabayashi, H.Takahashi und N.K.Gonatas. 2000. Fragmentation of the Golgi apparatus of the ballooned neurons in patients with corticobasal degeneration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 100:270-274.
- Sambrook, J., E.F.Fritsch und T.Manias. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Satoh, A., Y.Wang, J.Malsam, M.B.Beard und G.Warren. 2003. Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic*. 4:153-161.
- Schachter, J. und A.O.Osoba. 1983. Lymphogranuloma venereum. *Br. Med. Bull.* 39:151-154.
- Schekman, R. und L.Orci. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271:1526-1533.
- Schroer, T.A., E.R.Steuer und M.P.Sheetz. 1989. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell* 56:937-946.
- Schultz, J., T.Doerks, C.P.Ponting, R.R.Copley und P.Bork. 2000. More than 1,000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nat. Genet.* 25:201-204.
- Schweizer, A., J.A.Fransen, T.Bachi, L.Ginsel und H.P.Hauri. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 107:1643-1653.

- Scidmore, M.A., E.R.Fischer und T.Hackstadt. 1996a. Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the Chlamydia trachomatis inclusion. *J. Cell Biol.* 134:363-374.
- Scidmore, M.A., E.R.Fischer und T.Hackstadt. 2003. Restricted fusion of Chlamydia trachomatis vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect. Immun.* 71:973-984.
- Scidmore, M.A., D.D.Rockey, E.R.Fischer, R.A.Heinzen und T.Hackstadt. 1996b. Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect. Immun.* 64:5366-5372.
- Scidmore-Carlson, M.A., E.I.Shaw, C.A.Dooley, E.R.Fischer und T.Hackstadt. 1999. Identification and characterization of a Chlamydia trachomatis early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Mol. Microbiol.* 33:753-765.
- Seaman, J.T. 1985. Chlamydia isolated from abortion in sheep. *Aust. Vet. J.* 62:436.
- Seemann, J., E.Jokitalo, M.Pypaert und G.Warren. 2000. Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* 407:1022-1026.
- Short, B., A.Haas und F.A.Barr. 2005. Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1744:383-395.
- Short, B., C.Preisinger, J.Schaletzky, R.Kopajtich und F.A.Barr. 2002. The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr. Biol.* 12:1792-1795.
- Shorter, J., R.Watson, M.E.Giannakou, M.Clarke, G.Warren und F.A.Barr. 1999. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* 18:4949-4960.
- Slusarewicz, P., T.Nilsson, N.Hui, R.Watson und G.Warren. 1994. Isolation of a matrix that binds medial Golgi enzymes. *J. Cell Biol.* 124:405-413.
- Smith, A.C., W.D.Heo, V.Braun, X.Jiang, C.Macrae, J.E.Casanova, M.A.Scidmore, S.Grinstein, T.Meyer und J.H.Brumell. 2007. A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Cell Biol.* 176:263-268.
- Sohda, M., Y.Misumi, S.Yoshimura, N.Nakamura, T.Fusano, S.Sakisaka, S.Ogata, J.Fujimoto, N.Kiyokawa und Y.Ikehara. 2005. Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:1268-1274.
- Soldati, T., M.A.Riederer und S.R.Pfeffer. 1993. Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein. *Mol. Biol. Cell* 4:425-434.
- Sollner, T., M.K.Bennett, S.W.Whiteheart, R.H.Scheller und J.E.Rothman. 1993a. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418.
- Sollner, T., S.W.Whiteheart, M.Brunner, H.Erdjument-Bromage, S.Geromanos, P.Tempst und J.E.Rothman. 1993b. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.



- Sonnichsen, B., S.De Renzis, E.Nielsen, J.Rietdorf und M.Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149:901-914.
- Sonnichsen, B., M.Lowe, T.Levine, E.Jamsa, B.Dirac-Svejstrup und G.Warren. 1998. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* 140:1013-1021.
- Stamp, J.T., J.A.Watt und R.B.Cockburn. 1952. Enzoootic abortion in ewes; complement fixation test. *J. Comp Pathol.* 62:93-101.
- Stephens, R.S., S.Kalman, C.Lammel, J.Fan, R.Marathe, L.Aravind, W.Mitchell, L.Olinger, R.L.Tatusov, Q.Zhao, E.V.Koonin und R.W.Davis. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282:754-759.
- Stieber, A., Z.Mourelatos und N.K.Gonatas. 1996. In Alzheimer's disease the Golgi apparatus of a population of neurons without neurofibrillary tangles is fragmented and atrophic. *Am. J. Pathol.* 148:415-426.
- Strom, M., A.N.Hume, A.K.Tarafder, E.Barkagianni und M.C.Seabra. 2002. A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277:25423-25430.
- Stuart, E.S., W.C.Webley und L.C.Norkin. 2003. Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells. *Exp. Cell Res.* 287:67-78.
- Sun, Y., A.Shestakova, L.Hunt, S.Sehgal, V.Lupashin und B.Storrie. 2007. Rab6 regulates both ZW10/RINT-1 and conserved oligomeric Golgi complex-dependent Golgi trafficking and homeostasis. *Mol. Biol. Cell* 18:4129-4142.
- Ullrich, O., H.Stenmark, K.Alexandrov, L.A.Huber, K.Kaibuchi, T.Sasaki, Y.Takai und M.Zerial. 1993. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J. Biol. Chem.* 268:18143-18150.
- Valderrama, F., T.Babia, I.Ayala, J.W.Kok, J.Renau-Piqueras und G.Egea. 1998. Actin microfilaments are essential for the cytological positioning and morphology of the Golgi complex. *Eur. J. Cell Biol.* 76:9-17.
- van Ooij, C., G.Apodaca und J.Engel. 1997. Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infect. Immun.* 65:758-766.
- Vanrompay, D., R.Ducatelle und F.Haesebrouck. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.* 45:93-119.
- Walter, M., J.P.Davies und Y.A.Ioannou. 2003. Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes. *J. Lipid Res.* 44:243-253.
- Wang, Y., J.H.Weij, B.Bisel, D.Tang und J.Seemann. 2008. Golgi cisternal unstacking stimulates COPI vesicle budding and protein transport. *PLoS. ONE.* 3:e1647.
- Ward, T.H., R.S.Polishchuk, S.Caplan, K.Hirschberg und J.Lippincott-Schwartz. 2001. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* 155:557-570.



- Wehrl, W., V.Brinkmann, P.R.Jungblut, T.F.Meyer und A.J.Szczepek. 2004. From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol. Microbiol.* 51:319-334.
- WHO. 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. *World Health Organization, Geneva.*
- Wilcke, M., L.Johannes, T.Galli, V.Mayau, B.Goud und J.Salamero. 2000. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* 151:1207-1220.
- Wirtz, K.W. 1991. Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60:73-99.
- Wittenbrink, M.M., X.Wen, N.Bohmer, G.Amtsberg und A.Binder. 1991. [Bacteriologic studies of the occurrence of Chlamydia psittaci in organs of swine and in aborted swine fetuses]. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 38:411-420.
- Wiznerowicz, M. und D.Trono. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77:8957-8961.
- Wolf, K., E.Fischer und T.Hackstadt. 2000. Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells. *Infect. Immun.* 68:2379-2385.
- Wolf, K. und T.Hackstadt. 2001. Sphingomyelin trafficking in Chlamydia pneumoniae-infected cells. *Cell Microbiol.* 3:145-152.
- Wreghitt, T. 1993. Chlamydial infection of the respiratory tract. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 3:R119-R124.
- Wylie, J.L., G.M.Hatch und G.McClarty. 1997. Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by Chlamydia trachomatis. *J. Bacteriol.* 179:7233-7242.
- Xia, M., R.E.Bumgarner, M.F.Lampe und W.E.Stamm. 2003. Chlamydia trachomatis infection alters host cell transcription in diverse cellular pathways. *J. Infect. Dis.* 187:424-434.
- Yang, L. und H.W.Huang. 2002. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* 297:1877-1879.
- Yoshida, Y., M.Kinuta, T.Abe, S.Liang, K.Araki, O.Cremona, G.Di Paolo, Y.Moriyama, T.Yasuda, P.De Camilli und K.Takei. 2004. The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 23:3483-3491.
- Zerial, M. und H.McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:107-117.
- Zhang, J.P. und R.S.Stephens. 1992. Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 69:861-869.

## VI. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas F. Meyer für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Unterstützung und die vielen motivierenden und hilfreichen Vorschläge bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Uckert für die Übernahme der Betreuung an der Humboldt-Universität, sein stetes Interesse an dieser Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Antje Flieger danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Dr. Dagmar Heuer danke ich herzlichst für die tolle Betreuung auf der Suche nach dem chlamydialen Rab-Gral, ihr offenes Ohr in allen „Labor“lagen, die vielen motivierenden und anregenden Gespräche und ihre unendliche Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Volker Brinkmann, Britta Laube, Christian Goosmann und Dr. Hans Thorn danke ich für das Entfachen meiner Begeisterung für die Mikroskopie.

Ebenso danke ich Dr. Nikolaus Machuy, Dr. Alexander Karlas und dem gesamten RNAi-Team für das Laufenlernen in der großen Welt des Silencing.

Dem gesamten Chlamydienlabor und allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für den Spaß und die gute Laune sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors.

Bei Dr. Marion Rother, Dr. Nikolaus Machuy und Alexander Rathgeb möchte ich mich für die konstruktiven Korrekturen und den akribischen Kampf gegen meine Schusseligkeitsfehlär bedanken. Ein Dankeschön auch an Bianca Bauer für die spitzenmäßige Hilfe bei der grafischen Gestaltung.

Ganz besonderes möchte ich mich bei meinen Mädels bald-Dr. Bianca Bauer, Dr. Dagmar Heuer, Dr. Andrea Wehrens und Dr. Martin Beisiegel für die unzähligen Kaffchen, Diskussionen, den Riesenspaß in allen Situationen und den herrlichen Trashtalk bedanken. Mädels, ihr seid die Besten!!!

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie für Ihr absolutes Vertrauen und Ihre Geduld mit meinem Temperament, vor allem während der Fertigstellung der Arbeit.

Von Herzen danke ich meinem Freund Christian Hennings für die aufgebrauchte Geduld und die liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit. \*kyuss\*

## PUBLIKATIONSLISTE

### TEILE DIESER ARBEIT WURDEN BZW. WERDEN WIE FOLGT VERÖFFENTLICHT:

Dagmar Heuer, Anette Rejman Lipinski, Nikolaus Machuy, Alexander Karlas, Andrea Wehrens, Frank Siedler, Volker Brinkmann, and Thomas F. Meyer. *Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. Akzeptiert bei *Nature*.

Anette Rejman Lipinski, Charlotte Meissner, Thomas F. Meyer and Dagmar Heuer. Rab6 and Rab11 regulate chlamydia-induced Golgi fragmentation. In Vorbereitung.

Thomas F. Meyer, Trent Fowler, Anette Rejman Lipinski, Dagmar Heuer, Elke Müller, Thomas Rudel, Nikolaus Machuy, Stephan Becker und Ute Krüger. 2005. RNA interference and infectious agents. *Nova Acta Leopoldina* NF 92: 199-205.

### BEITRÄGE AUF KONFERENZEN:

#### **2004 5th meeting European Society for Chlamydia research**

Anette Rejman Lipinski, Thomas F. Meyer, Agnes Szczepek and Dagmar Heuer. 2004. Interaction of *Chlamydia trachomatis* with the host cell trafficking pathways-studies with use of RNA interference (siRNA-approach). 5th meeting European Society for Chlamydia research, Budapest (Vortrag).

#### **2005 3. Deutscher Chlamydien-Workshop**

Anette Rejman Lipinski, Thomas F. Meyer, Agnes Szczepek und Dagmar Heuer. 2005. Bedeutung intrazellulärer Transportwege für eine produktive Vermehrung von *Chlamydia trachomatis*. 3. Deutscher Chlamydien-Workshop, Jena (Vortrag).

#### **2005 ZIBI-Forschungswochenende**

Dagmar Heuer, Anette Rejman Lipinski and Thomas F. Meyer. 2005. Loss of cellular proteins involved in the secretory pathway enhance *Chlamydia trachomatis* growths. ZIBI-Forschungswochenende, Teikyo University Berlin Campus, Zeuthen (Vortrag).

#### **2006 58. Mosbacher Kolloquium "Protein and lipid sorting in health and disease",**

Anette Rejman Lipinski, Dagmar Heuer, Nikolaus Machuy, Hans Thorn and Thomas F. Meyer. 2007. Interactions of *Chlamydia trachomatis* with host cell trafficking pathways (siRNA approach). 58. Mosbacher Kolloquium "Protein and lipid sorting in health and disease". Mosbach (Poster).

#### **2008 6th meeting European Society for Chlamydia research**

Anette Rejman Lipinski, Charlotte Meissner, Thomas F. Meyer and Dagmar Heuer. 2008. Which way to go? - Rab Proteins regulate *Chlamydia trachomatis* infection. 6th meeting European Society for Chlamydia research, Aarhus (Poster).

Berlin, den

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

---

Anette Rejman Lipinski